



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
DEL NOROESTE, S.C.

---

---

Programa de Estudios de Posgrado

**SELECCIÓN Y EVALUACIÓN DE BACTERIAS DEL  
TRACTO DIGESTIVO DEL PECTÍNIDO MANO DE  
LEÓN (*Nodipecten subnodosus*) Y DE LA CONCHA  
NÁCAR (*Pteria sterna*) CON USO POTENCIAL  
PROBIÓTICO EN LA ACUICULTURA DE  
BIVALVOS MARINOS**

**TESIS**

Que para obtener el grado de

**Doctor en Ciencias**

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales

(Orientación Acuicultura)

P r e s e n t a

**FERNANDO ABASOLO PACHECO**

La Paz, Baja California Sur, Julio de 2015

## ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 13 horas del día 15 del Mes de JUNIO del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Selección y evaluación de bacterias del tracto digestivo del pectínido mano de león (*Nodipecten subnodosus*) y de la concha nácar (*Pteria sterna*) con uso potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos marinos”

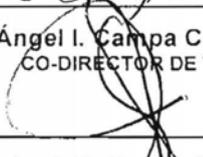
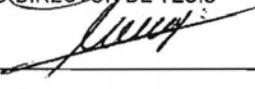
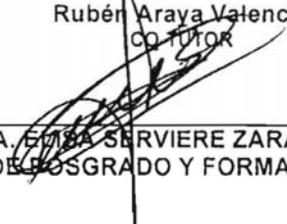
Presentada por el alumno:

Fernando Abasolo Pacheco

Aspirante al Grado de DOCTOR EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN Acuicultura

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

### LA COMISION REVISORA

 Ángel I. Campa Córdova CO-DIRECTOR DE TESIS	 Pedro E. Saucedo Lastra CO-DIRECTOR DE TESIS
 José M. Mazón Suástegui CO-TUTOR	 Daríel Tovar Ramírez CO-TUTOR
 Rubén Araya Valencia CO-TUTOR	
 DRA. EDITHA SERVIERE ZARAGOZA, DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS	

## **CONFORMACIÓN DE COMITÉS**

### **COMITÉ TUTORIAL**

Dr. Angel I. Campa Córdova (CIBNOR)  
Co-Director de Tesis

Dr. Pedro E. Saucedo Lastra (CIBNOR)  
Co-Director de Tesis

Dr. José M. Mazón Suástegui (CIBNOR)  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Dariel Tovar Ramírez (CIBNOR)  
Co-Tutor de Tesis

Dr. Rubén Araya Valencia (Universidad de Antofagasta, UA)  
Co-Tutor de Tesis

### **COMITÉ REVISOR DE TESIS**

Dr. Angel I. Campa Córdova

Dr. Pedro E. Saucedo Lastra

Dr. José M. Mazón Suástegui

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Rubén Araya Valencia

### **JURADO DE EXAMEN DE GRADO**

Dr. Angel I. Campa Córdova

Dr. Pedro E. Saucedo Lastra

Dr. José M. Mazón Suástegui

Dr. Dariel Tovar Ramírez

Dr. Jorge E. Chávez Villalba (CIBNOR, Unidad Guaymas)

### **SUPLENTE**

Dra. Cristina Escobedo Fregoso (CIBNOR)

## RESUMEN

Dada la importancia de la selección adecuada de las cepas de probióticos para la acuicultura de bivalvos, el objetivo del presente trabajo fue seleccionar bacterias con potencial probiótico para mejorar la supervivencia, crecimiento y salud general de bivalvos de interés comercial. El trabajo se dividió en dos etapas: En la primera se aislaron y seleccionaron bacterias con potencial probiótico del tracto gastrointestinal (TGI) de dos especies de bivalvos marinos (*Nodipecten subnodosus* y *Pteria sterna*), mediante pruebas *in vitro* que incluyeron la actividad hemolítica, el antagonismo contra *Vibrio* spp., la hidrofobicidad bacteriana y la producción de enzimas extracelulares. Se lograron seleccionar cinco cepas identificadas como: *Lactobacillus graminis* (RL5), *Lactobacillus plantarum* (C3), *Bacillus cereus* (PB1-1), *Bacillus flexus* (PB1-5) y *Bacillus firmus* (PB1-6), de las cuales RL5 y C3 mostraron amplia actividad antimicrobiana contra *Vibrio alginolyticus* (CAIM 57), *V. harveyi* (CAIM 1793), *V. vulnificus* (CAIM 157) y *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), mientras que PB1-1, PB1-5 y PB1-6 mostraron actividad enzimática para amilasa, proteasa, lipasa y celulasa. Por su parte, los aislados C3 y PB1-5 fueron altamente hidrofóbicos. En la segunda etapa del trabajo, las cepas seleccionadas se evaluaron *in vivo* como probióticos con dos especies de bivalvos de interés comercial: el ostión Kumamoto *Crassostrea sikamea* (juveniles) y la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* (larvas y juveniles). El objetivo fue determinar si las cepas seleccionadas conferían amplios beneficios para todas las etapas de desarrollo (larvas veliger tempranas, larvas pediveliger tardías, juveniles tempranos fijados) o si los efectos fueron específicos para cada cepa en cada estadio y especie hospedera. Las cepas fueron suministradas de forma individual y combinada a manera de ocho tratamientos probióticos (RL5, C3, PB1-1, PB1-5, PB1-6, MIX-L, MIX-B y MIX-LB), un tratamiento con ampicilina y un grupo control. Los tratamientos se suministraron a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> cada 48 h. En larvas se evaluó la supervivencia, el crecimiento y la fijación. En juveniles se evaluó la supervivencia, crecimiento y composición bioquímica. Adicionalmente se determinó la supervivencia y actividad de la enzima superóxido-dismutasa (SOD) en juveniles de *A. ventricosus* retados contra *V. alginolyticus*. En larvas, las cepas RL5 y C3 mejoraron la supervivencia y crecimiento de *A. ventricosus* en comparación con el control, en tanto que la mayor fijación de juveniles ocurrió con las cepas MIX-LB (*Lactobacillus* sp. + *Bacillus* sp.). Por otro lado, los juveniles de *A. ventricosus* mejoraron su crecimientos en talla y peso, e incrementaron significativamente el contenido de proteínas con el tratamiento C3. En juveniles de *C. sikamea* se observó el mismo efecto, pero con el MIX-B. Con respecto al reto, la mayor protección contra *V. alginolyticus* se dio con juveniles de *A. ventricosus* tratados con

MIX-B, lo cual se reflejó en una mayor supervivencia (>80%) y un aumento significativo de la actividad de la SOD. Estos resultados indican que el mecanismo de acción de las cepas probióticas es específico para cada etapa de desarrollo y hospedero evaluado, generando respuestas diferenciales que incluyen la protección contra patógenos, antagonismo y exclusión, mejor asimilación de nutrientes, y fortalecimiento del sistema inmune. La microbiota seleccionada mostró propiedades probióticas durante las dos etapas evaluadas, y se recomiendan para ser usadas en el cultivo de otras especies de bivalvos marinos.

**Palabras clave:** tracto gastrointestinal, probióticos, acuicultura de bivalvos, crecimiento, supervivencia, protección a *Vibrio alginolyticus*.

## ABSTRACT

Given the importance of selecting suitable probiotic treatments for bivalve aquaculture, we selected bacterial strains with potential probiotic to improve survival, growth, and overall health of bivalve mollusks of commercial interest. The study was divided in two stages: In the first one, we isolated and selected microbiota with potential probiotic from gastrointestinal tract (GIT) of two marine bivalves (*Nodipecten subnodosus* and *Pteria sterna*), using *in vitro* tests that included hemolytic activity, antagonism against *Vibrio* spp., bacterial hydrophobicity, and production of extracellular enzymes. Five bacterial strains were selected and identified as *Lactobacillus graminis* (RL5), *Lactobacillus plantarum* (C3), *Bacillus cereus* (PB1-1), *Bacillus flexus* (PB1-5) and *Bacillus firmus* (PB1-6). The RL5 and C3 isolates showed antimicrobial activity against *Vibrio alginolyticus* (CAIM 57), *V. harveyi* (CAIM 1793), *V. vulnificus* (CAIM 157) and *V. parahaemolyticus* (ATCC 17802), and the PB1-1, PB1-5, and PB1-6 isolates showed enzymatic activity for amylase, protease, lipase, and cellulose: The C3 and PB1-5 isolates were highly hydrophobic. In the second stage of this study, the selected strains were tested *in vivo* as probiotics with two bivalve species of commercial value: the Kumamoto *Crassostrea sikamea* oyster (juveniles) and the Catarina scallop *Argopecten ventricosus* (larvae and juveniles). The goal was to determine if the selected strains conferred broad benefits to all developmental stages (early veliger larvae, late pediveliger larvae, early settled juveniles), or conferred stage-specific benefits. The strains were provided as single and multi-strain treatments (RL5, C3, PB1-1, PB1-5, PB1-6, MIX-L, MiX-B y MIX-LB), including a treatment with ampicillin and a control group. All strains were administered at a dose of  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> every 48 h. The evaluated traits were survival, growth and settlement (larvae) and survival, growth and biochemical composition (juveniles). Additionally, we determined survival and activity of superoxide dismutase enzyme (SOD) in *A. ventricosus* juveniles challenged against *V. alginolyticus*. In larvae, improved survival and growth occurred with RL5 and C3 strains over the control, while enhanced settlement of juveniles occurred with MIX-LB (*Lactobacillus* sp. + *Bacillus* sp.). *Argopecten ventricosus* juveniles grew significantly faster and larger in size and weight, and significantly increased their protein content when treated with C3. The pattern with *C. sikamea* juveniles was similar, but with MIX-B. Differently, greater protection against *V. alginolyticus* occurred in *A. ventricosus* juveniles treated with MIX-B, which reflected in higher survival (>80%) and a significant increase in SOD activity. These findings indicate that the action mechanisms of evaluated bacteria are strain-specific and stage-specific, and generated in the target bivalve different responses that include protection against pathogens, antagonism and exclusion, improved nutrient

assimilation, and strengthened digestive and immune systems. In conclusion, the selected microbiota showed probiotic properties during all developmental stages and recommended for increasing production of hatchery-reared bivalves.

**Keywords:** Gastrointestinal tract, probiotics, bivalve aquaculture, growth, survival, protection to *Vibrio alginolyticus*.

## DEDICATORIA

---

A mis padres por darme siempre su apoyo incondicional y darme todo lo necesario para alcanzar mis metas, a ustedes siempre mi amor y agradecimiento.

A mi esposa Yarelys Ferrer por su amor y apoyo incondicional, por estar siempre conmigo y para mí.

A mis hermanos Clara y Luis, y a mi cuñis Gris por todo su apoyo y cariño.

A mis sobrinos hermosos Cori y Mati.

A mis abuelos por su cariño.

A toda mi familia, por todo su cariño y apoyo.

A mi familia Cubana, por quererme y apoyarme.

## AGRADECIMIENTOS

Al Centro de Investigaciones Biológicas de Noroestes S.C. (CIBNOR) por la oportunidad y apoyo durante todo el tiempo que llevó la realización de este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgarme la beca de doctorado número 316779. Y las becas MIXTAS número 290749 y 290842. Al proyecto SEP-CONACyT no. 81249 y PROINNOVA-CONACyT no. 199788.

A mis co-directores de tesis el Dr. Angel Campa Córdova y el Dr. Pedro Saucedo Lastra por todo su apoyo, confianza y sobre todo por su amistad brindada durante estos cuatro años de doctorado (y dos mas de maestría), gracias por guiarme y brindarme todas sus enseñanzas, las cuales fueron y serán muy importantes para mi formación profesional.

A mis co-tutores, el Dr. Manuel Mazón Suátegui, Dr. Dariel Tovar Ramírez y el Dr. Rubén Araya Valencia por su amistad y apoyo durante estos cuatro años para llevar a buen termino mi trabajo de investigación, gracias por todas sus enseñanzas y aportaciones a mi trabajo y a mi formación profesional.

A los técnicos Horacio Bervera y Juan José Ramírez (Johnny), por su apoyo para la recolecta de organismos para mi trabajo, y sobre todo gracias por su amistad y todas sus orientaciones a lo largo de la mayor parte del tiempo de mi formación profesional. A Norma Ochoa Álvarez del Laboratorio de Diagnóstico Microbiológico por todas sus enseñanzas en el campo de la microbiología, por su amistad y todo su apoyo para concluir mi trabajo. A Delfino Barajas Frías y Pablo Ormart Castro del Laboratorio de Moluscos por su valioso apoyo en el cultivo de larvas y juveniles de bivalvos marinos, gracias por su amistad y todas las valiosas enseñanzas que me brindaron. Así mismo a Julián Garzón Favela del Laboratorio de Microalgas por el apoyo y asesorías brindadas en el cultivo de microalgas. A Sandra De La Paz Reyes por su apoyo en la realización de mi trabajo y sobre todo por su amistad. A Víctor Moyrón y Emerson Zuñiga por su apoyo para lograr cumplir el primer objetivo de mi trabajo. Así mismo a los técnicos del Laboratorio de Análisis Químico de Agua Ibán Murillo Murillo y Celina Beltrán Camacho por su apoyo en el análisis de las diferentes muestras de agua. A Roberto Hernández Herrera del Laboratorio de Bioquímica Fisiológica por su asesoría y apoyo en el análisis de muestras de bivalvos marinos. A Arturo Sierra Beltrán por el apoyo y asesorías en el uso del Laboratorio de Bioseguridad del CIBNOR. A Martín Ramírez Orozco y Jenny del

Laboratorio de Biomedicina Bioquímica y Molecular por su apoyo y asesorías en la identificación molecular de bacterias marinas. A Carmen Rodríguez Jaramillo del Laboratorio de Histología e Histoquímica por sus asesorías en el uso del manejo del microscopio de fluorescencia. A los técnicos del Taller de Maquinados Jorge Cobos Anaya, Guillermo García Cortes, Alfonso Álvarez Casillas y Carlos Soto Carrasco por su apoyo en la asesoría y construcción de un sistema de cultivo para este trabajo. Así mismo a Sixto Rosas Amador del Taller de Servicios, Carpintería y Apoyo Técnico.

Al personal de Posgrado: Dra. Elisa Serviere, Lic. Osvelia Ibarra, Lic. Leticia González, Horacio Sandoval, Tania Nuñez, Claudia Olachea y Ma. Guadalupe Sánchez. A Susana Luna García y María Esther Ojeda Castro por el apoyo brindado en la búsqueda de información científica. A Ira Fogel editor del CIBNOR, por sus valiosas enseñanzas y apoyo para la publicación de artículos científicos.

Al Sr. Adán Altamirano de la empresa SISTEMAR, a Miguel Robles de ACUACULTURA ROBLES y a la empresa MARIMEX DEL PACÍFICO, S.A. de C.V. por la donación de los organismos marinos. A la empresa BIO-ARCADIA Consultores Ambientales e Investigación S.C. por todo el apoyo brindado.

A todos los amigos de la Universidad de Antofagasta (UA) en Chile (Dr. José Riascos, Alejandro, Paola, Alex, Gabriel, Jimena, Paty) y del Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (IRTA) en España por todo el apoyo brindado durante las estancias científicas realizadas. Gracias a la Dra. Alicia Estévez y Dra. Dolors Furones por su apoyo, y gracias a Carme, Xavi, Zohar, Isasi, Esteban, Josu, María Jesús, y Noelia, gracias a todos por su apoyo y sobre todo por su amistad.

A mis amigos cubanos y mexicanos: Yarelis, Carlos Michel, Juan José, Daulemys, Yuneisy, Ana Bricia, Laurita, Cristina, José Maldonado (Quina), Dalia, Meli, Amada, Sandriux, Mila, Yeni, Mike, Grecia, Alicia, Alondra, Angie, Antonia, Will, Arlett, Armando, Dalia, Evelyn, Ana Claudia, Ivone, Erika M., Christian, David, Carlos, Jaky, Vero, Haru, Joel, Miguel, Rafa, A. Laura, Claudia, Pilar, Coco ... y a todos mis amigos que no mencione pero no por eso dejan de ser muy importantes... Finalmente a todas las personas que de alguna u otra forma contribuyeron en la realización de este trabajo, muchas gracias.

## CONTENIDO

<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
2.1 Estudios sobre bivalvos de importancia comercial en la acuicultura del noroeste de México .....	4
2.1.1 Ostreidos.....	4
2.1.2 Pectínidos .....	6
2.1.3 Ostras perleras .....	9
2.2 Uso de probióticos en la acuicultura: Definición, modos de acción y selección. ....	10
2.3 Principales microorganismos usados como probióticos en la acuicultura ..	18
2.4 Evaluación de probióticos en la acuicultura de larvas y juveniles de bivalvos marinos.....	20
2.4.1 Larvas .....	20
2.4.2 Juveniles .....	22
<b>3. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>4. HIPÓTESIS .....</b>	<b>24</b>
<b>5. OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
5.1 Objetivo general .....	25
5.1.1 Objetivos específicos .....	25
<b>6. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
<b>6.1 PARTE I. Bioensayos <i>in vitro</i>: Aislamiento, caracterización y selección de cepas con potencial probiótico.....</b>	<b>26</b>
6.1.1 Obtención de organismos .....	26
6.1.2 Toma de muestras del TGI .....	27
6.1.3 Aislamiento de bacterias .....	28
6.1.4 Purificación de bacterias .....	29
6.1.5 Actividad hemolítica en eritrocitos de las bacterias aisladas.....	30
6.1.6 Actividad hemolítica en hemocitos de las bacterias aisladas.....	31
6.1.7 Selección de bacterias con actividad antagónica a vibrios .....	32
6.1.7.1 Preparación del inóculo de bacterias prueba .....	32
6.1.7.2 Preparación del inóculo de vibrios .....	32
6.1.8 Enzimas extracelulares .....	34
6.1.8.1 Hidrólisis de caseína y gelatina (producción de proteasas) .....	34
6.1.8.2 Hidrólisis de Tween 80 (producción de lipasas).....	35
6.1.8.3 Hidrólisis de almidón (producción de amilasas) .....	36
6.1.8.4 Hidrólisis de celulosa (producción de celulasa) .....	36
6.1.9 Curva de crecimiento .....	36
6.1.10 Pruebas bioquímicas primarias .....	37
6.1.10.1 Tinción de Gram .....	37
6.1.10.2 Oxidasa.....	37
6.1.10.3 Catalasa.....	38

6.1.10.4 Formación de esporas .....	38
6.1.11 Pruebas de hidrofobicidad .....	39
6.1.11.1 Rojo Congo .....	39
6.1.11.2 Método de Adhesión Bacteriana a Hidrocarburos (Microbial Adhesion To Hydrocarbons, MATH) .....	39
6.1.11.3 Medida del Ángulo de Contacto (Contact Angle Meter testing, CAM).....	40
6.1.12 Identificación molecular de las cepas con potencial probiótico .....	41
6.1.13 Preservación de cepas con potencial probiótico .....	42
<b>6.2 PARTE II. Bioensayos <i>in vivo</i>: Evaluación de cepas seleccionadas con potencial probiótico en larvas y juveniles de moluscos bivalvos .....</b>	<b>43</b>
6.2.1 Obtención de juveniles de <i>C. sikamea</i> .....	43
6.2.2 Obtención de reproductores y larvas de <i>A. ventricosus</i> .....	44
6.2.2.1 Seguimiento del desarrollo larvario.....	45
6.2.3 Obtención de juveniles de <i>A. ventricosus</i> .....	46
6.2.4 Tratamiento de agua de mar para los bioensayos .....	47
6.2.5 Cultivo de microalgas.....	47
6.2.6 Reactivación de cepas con potencial probiótico .....	48
6.2.7 Bioensayo 1: Evaluación de cepas probióticas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y composición bioquímica de juveniles de <i>C. sikamea</i> .....	49
6.2.8 Bioensayo 2: Evaluación de cepas probióticas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y fijación de larvas de <i>A. ventricosus</i> .....	51
6.2.9 Bioensayo 3. Evaluación de cepas probióticas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y composición bioquímica de juveniles de <i>A. ventricosus</i> .....	51
6.2.10 Bioensayo 4: Evaluación en juveniles de <i>A. ventricosus</i> , previamente tratados con los probióticos seleccionados, en un reto con <i>V. alginolyticus</i> . .	52
6.3 Parámetros evaluados.....	53
6.3.1 Crecimiento absoluto ( $\mu\text{m}$ ), tasa de crecimiento ( $\mu\text{m d}^{-1}$ ) y supervivencia (%) de larvas.....	53
6.3.2 Crecimiento absoluto (mm, mg), tasa de crecimiento ( $\text{mm d}^{-1}$ , $\text{mg d}^{-1}$ ) peso seco y supervivencia (%) de juveniles.....	54
6.3.3 Tasa de fijación de juveniles .....	56
6.3.4 Análisis bioquímicos de juveniles.....	56
6.3.4.1 Descalcificación .....	57
6.3.4.2 Carbohidratos totales.....	57
6.3.4.3 Proteínas totales.....	58
6.3.4.4 Lípidos totales.....	59
6.3.5 Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) .....	59
6.3.6 Conteo de <i>V. alginolyticus</i> .....	60
6.3.7 Tratamiento estadístico de los datos.....	61
<b>7. RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>7.1 PARTE I. Bioensayos <i>in vitro</i> .....</b>	<b>62</b>

7.1.1 Aislamiento y purificación de cepas de bacterias.....	62
7.1.2 Actividad hemolítica .....	62
7.1.3 Actividad antagónica .....	63
7.1.4 Actividad enzimática extracelular .....	70
7.1.5 Curva de crecimiento .....	71
7.1.6 Prueba de hidrofobicidad .....	73
7.1.7 Identificación molecular de las cepas aisladas con potencial probiótico .....	75
<b>7.2 PARTE II. Bioensayos <i>in vivo</i>.....</b>	<b>76</b>
7.2.1 Evaluación de las cepas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y composición bioquímica de juveniles de <i>C. sikamea</i> .....	76
7.2.1.1 Supervivencia .....	76
7.2.1.2 Crecimiento.....	76
7.2.1.3 Composición bioquímica.....	80
7.2.2 Evaluación de las cepas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y fijación de larvas de <i>A. ventricosus</i> .....	81
7.2.2.1 Supervivencia .....	82
7.2.2.2 Crecimiento absoluto, tasa de crecimiento y fijación larvaria.....	83
7.2.3 Evaluación de las cepas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y composición bioquímica de juveniles de <i>A. ventricosus</i> .....	86
7.2.3.1 Supervivencia .....	86
7.2.3.2 Crecimiento absoluto y tasa de crecimiento .....	86
7.2.3.3 Composición bioquímica.....	89
7.2.4 Respuesta de juveniles de la almeja Catarina <i>A. ventricosus</i> tratados con cepas las probióticas seleccionadas y retados con <i>V. alginolyticus</i> .....	90
7.2.4.1 Supervivencia .....	90
7.2.4.2 Actividad de la SOD.....	91
7.2.4.3 Conteo de bacterias <i>Vibrio</i> sp.....	93
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>94</b>
8.1 Selección de cepas con potencial probiótico: bioensayos <i>in vitro</i> .....	94
8.2 Validación del efecto de las cepas probióticas: bioensayos <i>in vivo</i> .....	102
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>113</b>
<b>10. LITERATURA CITADA .....</b>	<b>115</b>
<b>11. ANEXOS .....</b>	<b>143</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.**– Anatomía externa del ostión Japonés (*C. gigas*), el ostión Kumamoto (*C. sikamea*) y el ostión de placer (*C. corteziensis*). Fuente: Fisheries Research Agency (<http://tuna.fra.affrc.go.jp/english/press/2012/20120604.html>). ..... 6
- Figura 2.**– Anatomía externa de la almeja Catarina (*A. ventricosus*) y de la almeja mano de león (*N. subnodosus*). Fuente: Guido T. Poppe & Philippe Poppe - Conchology, Inc. ([www.conchology.be](http://www.conchology.be)). ..... 8
- Figura 3.**– Anatomía externa de la concha nácar (*P. sterna*). Fuente: Seashells Collection (<http://www.idscaro.net>). ..... 9
- Figura 4.**– Diagrama esquemático que ilustra los mecanismos potenciales por los cuales bacterias probióticas pueden impactar en la microbiota. Estos mecanismos incluyen (1) competencia por ingredientes de la dieta como substratos de crecimiento, (2) bioconversión de productos fermentados, por ejemplo, azúcares con propiedades inhibitorias, (3) producción de substratos de crecimiento, por ejemplo Exopolisacáridos o vitaminas, para el uso de otras bacterias, (4) antagonismo directo por bacteriocinas, (5) exclusión competitiva por los sitios de adhesión, (6) mejora de la función de barrera, (7) reducción de la inflamación, alterando así las propiedades intestinales para la colonización (8) estimulación de la respuesta inmune innata (por mecanismos desconocidos). IEC: células epiteliales, DC: células dendríticas, T: células T. O’Toole y Cooney, 2008). ..... 14
- Figura 5.**– Área de toma de organismos para: (1) el aislamiento y selección de bacterias probióticas y (2) validar las cepas probióticas *in vivo* en cultivos intensivos experimentales. .... 27
- Figura 6.**– Toma de muestra del tracto gastrointestinal (TGI) de *N. subnodosus* (almeja mano de león) y *P. sterna* (concha nácar). .... 28
- Figura 7.**– Purificación de cepas de acuerdo a su morfología colonial. .... 30
- Figura 8.**– Metodologías para evaluar el antagonismo de las cepas seleccionadas a *Vibrio* spp. (a) Método 1: Discos de agar; (b) Método 2: Sobrenadante en pocillos. .... 34
- Figura 9.**– Medición de ángulo de contacto entre una gota de agua destilada y una capa de bacterias (Mozes y Rouxhet, 1987), medido con un sistema modificado basado en un goniómetro. .... 41
- Figura 10.**– Unidades de Pre-engorda de semillas de moluscos con tamaño representativo, constituidas por una caja contenedora plástica y cilindros de surgencia con falso fondo de malla plástica contruidos con tubería PVC de 4 y 6 " que operan manteniendo un flujo ascendente y recirculante por medio de aerosifones (Diseño: Mazón-Suástegui 2014, CIBNOR, S.C.). .... 44

- Figura 11.**– Sistema de filtrado del agua de mar del laboratorio de cultivo de moluscos del CIBNOR. .... 47
- Figura 12.**– Unidades experimentales de 4 L utilizadas para el cultivo de larvas y juveniles en los bioensayos..... 50
- Figura 13.**– Unidades experimentales (UE-1L) utilizadas en el reto de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* con *V. alginolyticus*. .... 53
- Figura 14.**– Proporción de bacterias aisladas de acuerdo al tipo de hemólisis según el patrón descrito por Koneman *et al.* (2001). .... 62
- Figura 15.**– Halos de inhibición de las cepas RL5 y C3 retadas in vitro contra las cepas patógenas: (A) *V. alginolyticus* (CAIM57); (B) *V. parahaemolyticus* (ATCC17802); (C) *V. vulnificus* (CAIM157) y (D) *V. harveyi* (CAIM1793) aplicando la metodología de discos de agar (Metodología 1). .... 65
- Figura 16.**– Halos de inhibición de las cepas RL5 y C3 retadas in vitro contra las cepas patógenas: (A) *V. alginolyticus* (CAIM57); (B) *V. parahaemolyticus* (ATCC17802); (C) *V. vulnificus* (CAIM157) y (D) *V. harveyi* (CAIM1793) aplicando la metodología de pozos en agar (Metodología 2). .... 66
- Figura 17.**– Inhibición en presencia (Met. 1= Metodología 1) y ausencia de células (Met. 2= Metodología 2) de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* por bacterias aisladas de mano de león. Los datos expresan la media (mm)  $\pm$  DE (diámetro de inhibición). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. .... 67
- Figura 18.**– Inhibición en presencia (Met. 1= Metodología 1) y ausencia de células (Met. 2= Metodología 2) de *V. harveyi* y *V. vulnificus* por bacterias aisladas de mano de león. Los datos expresan la media (mm)  $\pm$  DE (diámetro de inhibición). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. .... 68
- Figura 19.**– Porcentaje de inhibición relativo de las cepas RL5 y C3 contra los vibrios patógenos seleccionados. Alta inhibición cuando porcentaje de inhibición relativo es  $>70\%$ , intermedia entre el  $50-70\%$  y baja cuando es  $<50\%$ . .... 69
- Figura 20.**– Curva de crecimiento (densidad óptica (D.O.) vs tiempo) en medio líquido MRS (RL5, C3) y TSC (PB1-1, PB1-5, PB1-6) de las bacterias seleccionadas, inoculadas durante 96 h a  $35^{\circ}\text{C}$ . Los puntos representan la media  $\pm$  D.E. .... 71
- Figura 21.**– Metodología de ángulo de contacto (CAM) para determinar la hidrofobicidad de las cepas de bacterias seleccionadas; (A) cepa RL5; (B) cepa C3; (C) cepa PB1-1 y (D) cepa PB1-5. .... 74

- Figura 22.**– Árbol filogenético basado en secuencias de genes de 16S rRNA de las bacterias aisladas. Árbol construido con un análisis de “bootstrap” con 500 réplicas. .... 76
- Figura 23.**– Crecimiento absoluto para evaluar la altura de la concha de juveniles del ostión Kumamoto *C. sikamea* tratados con las bacterias probióticas seleccionadas. Las líneas y las barras representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos en la leyenda se representan ordenados igual que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). .... 77
- Figura 24.**– Crecimiento absoluto para evaluar el peso húmedo de la concha de juveniles del ostión Kumamoto *C. sikamea* tratados con las bacterias probióticas seleccionadas. Las líneas y las barras representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos en la leyenda se representan ordenados igual que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). .... 78
- Figura 25.**– Porcentaje de supervivencia de larvas de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratadas con las cepas probióticas seleccionadas. Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. .... 82
- Figura 26.**– Crecimiento absoluto en la altura de la concha de larvas de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratadas con las cepas probióticas seleccionadas. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. .... 83
- Figura 27.**– Asentamiento larvario de larvas de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratadas con las bacterias probióticas seleccionadas. Las barras representan la media  $\pm$  DE. y se muestra el porcentaje de fijación. El símbolo (\*) representa diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ). .... 84
- Figura 28.**– Crecimiento absoluto en la altura de la concha de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratados con las cepas probióticas seleccionadas. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. .... 87
- Figura 29.**– Crecimiento absoluto en el peso húmedo total de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratados con las cepas probióticas seleccionadas. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura.

Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.  
..... 88

**Figura 30.**– Supervivencia de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratados con las cepas probióticas seleccionadas y retadas con *V. alginolyticus*. CTRL (-) representa a juveniles sin tratamiento y sin retar y CTRL (+) representa a juveniles sin tratamiento y retados. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. .... 91

**Figura 31.**– Conteo de *Vibrio* sp. en placas preparadas con agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) de muestras de agua de los tratamientos evaluados en el reto. .... 93

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla I.</b> – Patrón de hemólisis descrito por Koneman <i>et al.</i> (2001). .....	31
<b>Tabla II.</b> – Tratamientos experimentales de cepas de probióticos, antibiótico y grupo control utilizadas para los bioensayos de larvas y juveniles de <i>A. ventricosus</i> y juveniles de <i>C. sikamea</i> . .....	50
<b>Tabla III.</b> – Actividad antagónica de las bacterias seleccionadas en contra de cuatro vibrios patógenos marinos, determinada por la medición de halos de inhibición usando dos metodologías; (1) discos de agar (Metodología 1) y (2) pozos en agar (Metodología 2). .....	64
<b>Tabla IV.</b> – Producción de enzimas extracelulares (proteasa, lipasa, amilasa y celulasa) de las bacterias aisladas.....	70
<b>Tabla V.</b> – Pruebas bioquímicas primarias y actividad hemolítica de las cepas seleccionadas. ....	72
<b>Tabla VI.</b> – Pruebas de hidrofobicidad de la superficie de las bacterias seleccionadas .....	73
<b>Tabla VII.</b> – Identificación molecular de cepas seleccionadas, basada en el análisis del gen 16S rRNA. ....	75
<b>Tabla VIII.</b> – Tasa de crecimiento (altura y peso húmedo) y peso seco de juveniles del ostión Kumamoto <i>C. sikamea</i> tratados con los probióticos seleccionados. ....	79
<b>Tabla IX.</b> – Composición bioquímica de juveniles del ostión Kumamoto <i>C. sikamea</i> tratados con las cepas probióticas seleccionadas. ....	81
<b>Tabla X.</b> – Tasa de crecimiento de larvas (altura) y juveniles (altura y peso húmedo) de la almeja Catarina <i>A. ventricosus</i> tratados con los probióticos seleccionados. ....	85
<b>Tabla XI.</b> – Composición bioquímica de juveniles de la almeja Catarina <i>A. ventricosus</i> tratados con las cepas probióticas seleccionadas. ....	90
<b>Tabla XII.</b> – Actividad de la enzima SOD determinada por el porcentaje de inhibición de la formación del complejo WST-1 (water- soluble tetrazolium) Formazan en juveniles de la almeja Catarina <i>A. ventricosus</i> tratados previamente con las bacterias probióticas seleccionadas y posteriormente retados durante 120 h con <i>V. alginolyticus</i> (cepa CAIM57).....	92

## 1. INTRODUCCIÓN

En México la mayor producción acuícola intensiva de moluscos bivalvos se realiza en el noroeste, particularmente de ostreidos como *Crassostrea gigas*, pero existen además muchas especies nativas susceptibles a ser cultivadas y aprovechadas comercialmente como: las ostras perleras *Pteria sterna* y *Pinctada mazatlanica*, los pectínidos *Argopecten ventricosus* y *Nodipecten subnodosus*, los ostreidos *Crassostrea sikamea*, *C. gigas* y *C. corteziensis*. Para muchas de estas especies potenciales se tiene una metodología de producción bien establecida (Robles-Mungaray *et al.*, 1995; Saucedo *et al.*, 2007; Mazón-Suástegui *et al.*, 2005; 2011), sin embargo la producción de semilla en laboratorio continúa siendo un problema para algunas especies. Esto es debido, entre otras cosas, a la aparición de enfermedades infecciosas generadas principalmente por agentes microbianos, los cuales ocasionan altas mortalidades en momentos críticos del desarrollo, como el inicio de la alimentación exógena en larvas veliger tempranas y la culminación de la metamorfosis en larvas pediveliger tardías (Paillard *et al.*, 2004; Romero *et al.*, 2012). La presencia de patógenos en los laboratorios productores de semilla de bivalvos, reduce la supervivencia en larvas y juveniles tempranos, y este problema provoca un suministro insuficiente y discontinuo de semillas para la industria acuícola mexicana, que debiera diversificarse pero continua enfocada de manera dominante al camarón blanco *Litopenaeus vannamei* y al ostión japonés *C. gigas*.

La vibriosis es una de las enfermedades microbianas reportadas, más importantes a nivel mundial y la que más pérdidas económicas causa en la acuicultura de moluscos bivalvos (Freites *et al.*, 1993; Riquelme *et al.*, 1996; Lambert *et al.*, 1998; Sainz *et al.*, 2005). Es ocasionada por bacterias del género *Vibrio*, principalmente *Vibrio anguillarum* (Freites *et al.*, 1993; Angulo, 2000; Riquelme *et al.*, 1996), *V. splendidus* (Sugumar *et al.*, 1998), *V. natriegens* (Zhang *et al.*, 1998), *V. pectenocida* (Lambert *et al.*, 1998), *V. tapetis* (Borrego *et al.*, 1996) y *V. alginolyticus* (Tubiash *et al.*, 1965; Lodeiros *et al.*, 1987; Riquelme *et al.*, 1997;

Sainz *et al.*, 1999; Luna-González *et al.*, 2002).

Una revisión de la literatura concerniente a la problemática ocasionada por bacterias del género *Vibrio* y su interacción con el fitoplancton, bacterioplancton y organismos superiores puede encontrarse en Leyton y Riquelme (2008) y Beaz-Hidalgo *et al.* (2010). Estos patógenos y sus enfermedades asociadas se han venido controlando por años con antibióticos, pero su uso en acuicultura se ha reducido o erradicado por los diversos problemas que ocasionan, entre los que destacan el incremento de la resistencia bacteriana. El uso y abuso de antibióticos ha provocado un incremento gradual del nivel de patogenicidad de algunas cepas bacterianas, y la contaminación ambiental por el desecho al medio de las aguas tratadas con estas sustancias (O'Brien, 2002; Romero *et al.*, 2012).

El tratamiento de organismos cultivados con terapias más naturales y ecológicamente amigables, como los probióticos, continúa siendo una de las opciones más viables para el control o erradicación de patógenos marinos (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2008). Aunque el uso de probióticos en acuicultura no es novedoso, experimenta un resurgimiento debido a la bondad que ciertas cepas bacterianas han demostrado por tener la capacidad de producir compuestos microbianos y enzimas digestivas que, además de mejorar la nutrición del hospedero y facilitar la conversión de alimento, refuerzan su sistema inmune y capacidad de tolerancia al estrés (Verschuere *et al.*, 2000; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2010; Cordero *et al.*, 2014.). Otras cepas incluso degradan la materia orgánica y mejoran la calidad del agua en los sistemas de cultivo utilizadas con algunas especies de interés acuícola (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014; Nemutanzhela *et al.*, 2014). A la fecha, la generación de nuevo conocimiento sobre el efecto de probióticos en la acuicultura es menor en moluscos bivalvos que la reportada para camarones y peces. No obstante, existe un gran interés y avances recientes en el tema, que demuestran su potencial de aplicación en acuicultura (Prado *et al.*, 2010; Aguilar-Macias *et al.*, 2010; Campa-Córdova *et al.*, 2009a, 2011; Granados-Amores *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2011; Kapareiko *et al.*, 2011; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2012;

Karim *et al.*, 2013; Genard *et al.*, 2014).

Para el caso particular de los moluscos, recientemente se han aislado cepas probióticas con resultados prometedores para la acuicultura de bivalvos (Campa-Córdova *et al.*, 2009a, 2011; Lim *et al.*, 2011; Sánchez-Órtiz *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar del avance científico y tecnológico que se ha logrado con estos estudios, queda claro que la acción de los probióticos es compleja, y que particularmente en larvas y juveniles, se desconocen aún muchos de los mecanismos de acción de estos microorganismos (Vine *et al.*, 2006). Uno de los vacíos de información más importantes que se identifican radica en la forma cómo se establece la relación huésped-patógeno y las rutas metabólicas que favorecen la producción de metabolitos secundarios como puntos clave para establecer protocolos de aplicación y que mejoren los niveles de producción en el campo de la acuicultura de bivalvos. En esta relación, deben tenerse en cuenta factores como la dosis, repetición y método de administración de los probióticos en diferentes etapas del ciclo de vida de las especies en cultivo.

El presente trabajo tiene como objetivo aislar, seleccionar y caracterizar *in vitro* la microbiota benéfica del tracto digestivo de la almeja mano de león *N. subnodosus* y de la concha nácar *P. sterna*, para posteriormente evaluar su actividad en cultivos experimentales de algunas especies de bivalvos de interés comercial. Se manejaron tratamientos individuales y combinados en larvas de *A. ventricosus* (crecimiento, supervivencia y fijación) y en juveniles de almeja Catarina *A. ventricosus* y ostión Kumamoto *C. sikamea* (crecimiento, supervivencia, composición bioquímica), así como en la supervivencia y la respuesta antioxidante de juveniles de *A. ventricosus* retados contra *V. alginolyticus*. Una meta adicional establecida para los bioensayos *in vivo* fue determinar si los probióticos seleccionados confieren amplios beneficios para todas las etapas de vida de las especies objetivo, o si en particular aportan beneficios específicos en cada etapa del ciclo de vida de las especies evaluadas.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Estudios sobre bivalvos de importancia comercial en la acuicultura del noroeste de México

El cultivo de moluscos en México se ha desarrollado principalmente en el Océano Pacífico, donde históricamente se han explotado desde el punto de vista pesquero y/o acuícola, más de 54 especies (Baqueiro, 1984), lo que ha llevado a este país a ocupar el cuarto lugar de producción acuícola en América Latina, después de Chile, Brasil y Perú (FAO, 2008). En el noroeste mexicano se centra la mayor producción de bivalvos de importancia comercial, ya que existen muchas especies nativas susceptibles a ser cultivadas extensiva o intensivamente, entre las que se encuentran los pectínidos *A. ventricosus* y *N. subnodosus*, los ostiones *C. sikamea*, *Crassostrea corteziensis* y *Crassostrea gigas*, el hacha china *Atrina maura*, las ostras perleras *Pinctada mazatlanica* y *P. sterna*, las almejas blanca *Megapitaria aurantiaca* y chocolate *M. squalida*, el abulón azul *Haliotis fulgens* y el abulón amarillo *H. corrugata*, entre otras. A continuación se describen algunos de los trabajos mas recientes relativos a las especies objetivo utilizadas durante los bioensayos *in vitro* e *in vivo* de este estudio.

#### 2.1.1 Ostreidos

La acuicultura de bivalvos se ha centrado principalmente en la producción de ostreidos, ya que estos son los moluscos de mayor producción acuícola a nivel mundial (FAO, 2010). En México, el cultivo de ostiones ha tenido un desarrollo importante, particularmente con el ostión del Atlántico *Crassostrea virginica*, pero también en el Pacífico con el ostión japonés *C. gigas*, el ostión de placer *C. corteziensis* y el ostión Kumamoto *C. sikamea* (Figura 1). El ostión de placer ha sido objeto de diferentes estudios por su potencial de desarrollo (Maeda-Martínez, 2008; Mazón-Suástegui *et al.*, 2008, 2009; Campa-Córdova *et al.*, 2009a, 2011). La acuicultura de estas especies se proyecta como estable pero las perspectivas son inciertas, ya que existen severas restricciones y problemas en la producción de

juveniles en el laboratorio, causados principalmente por patógenos marinos (Maeda-Martínez, 2008). Por otro lado, el ostión Kumamoto *C. sikamea* (Amemiya, 1928), tiene su origen en Japón, y su estatus taxonómico ha sido objeto de debate. Esta especie había sido descrita como variedad de *C. gigas* por Amemiya (1928), pero posteriormente fue elevado a la categoría de especie por Ahmed (1975) y se diferencia de *C. gigas* por su menor crecimiento y menor talla comercial; por tener la valva izquierda profundamente ahuecada y la valva derecha plana, y en general por tener ambas conchas más arrugadas y surcadas que *C. gigas*. Sin embargo *C. sikamea* tiene un mejor sabor y por ello es más apetecible para consumo humano y más valorado en el mercado regional (Camara *et al.*, 2008). La introducción del ostión Kumamoto en México ocurrió en 1975 para su cultivo a pequeña escala en los estados de Baja California, Baja California Sur, Sonora y Sinaloa con semilla proveniente de Estados Unidos de América (SAGARPA, 2010). Son pocos los trabajos que se han realizado con esta especie, entre los que encontramos el estudio de su distribución y abundancia (Camara *et al.*, 2008; Hamaguchi *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013), producción de semilla (Nakano, 2007; Sou, 2008). También se ha estudiado el efecto de la salinidad en larvas de esta especie (Xu *et al.*, 2011), su biología reproductiva (Cáceres-Martínez *et al.*, 2012), enfermedades y parasitismo en adultos (Elston *et al.*, 2012; Cáceres-Martínez y Vásquez-Yeomans, 2013), y más recientemente, el estudio de los cambios en la composición y diversidad de la microbiota residente durante la producción comercial (Trabal Fernández *et al.*, 2014). Algo importante que señalar, es que en este último trabajo se reportan nuevas bacterias asociadas a ostiones comerciales en México, destacando entre ellas a *Burkholderia cepacia*, la cual produce un importante número de metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de bacterias patógenas marinas, entre ellas *V. alginolyticus* y *V. harveyi*. *B. cepacia* ha sido aislada del tractodigestivo de *C. corteziensis* y se ha evaluado su potencial probiótico en la acuicultura de bivalvos de importancia comercial (Campa-Córdova *et al.*, 2009a, 2011). A pesar de todos los avances reportados para lograr el cultivo eficiente de ostreidos en México, la presencia de patógenos asociados a

enfermedades bacterianas sigue siendo un factor limitante para el desarrollo sustentable de la acuicultura mexicana caracterizada por eventos periódicos de mortalidad en las granjas ostrícolas del país (Maeda-Martínez 2008).



**Figura 1.** – Anatomía externa del ostión Japonés (*C. gigas*), el ostión Kumamoto (*C. sikamea*) y el ostión de placer (*C. corteziensis*). Fuente: Fisheries Research Agency (<http://tuna.fra.affrc.go.jp/english/press/2012/20120604.html>).

### 2.1.2 Pectínidos

Por otro lado, los pectínidos *A. ventricosus* y *N. subnodosus*, conocidos como almeja Catarina y almeja mano de león respectivamente, también son un recurso importante en el noroeste de México (Figura 2). La almeja Catarina *A. ventricosus* (Sowerby II, 1842) posee particular importancia económica por la calidad de su músculo aductor, el cual es altamente apreciado para consumo humano y puede alcanzar un valor de USD\$12.00 kg<sup>-1</sup> (Maeda-Martínez, 2002). La especie se distribuye a lo largo del océano Pacífico oriental, desde Baja California (México) hasta Perú, aunque se encuentra en el golfo de California su máximo potencial de explotación comercial (Keen, 1971). En materia de investigación, se ha estudiado la susceptibilidad de larvas a enfermedades bacterianas (Sainz *et al.*, 1998; Luna-González *et al.*, 2002), la actividad de la fenol-oxidasa en larvas, juveniles y adultos (Luna-González *et al.*, 2003), el uso de antibióticos en cultivos larvarios (Campa-

Córdova *et al.*, 2005) y particularmente, el seguimiento del desarrollo larvario para optimizar los protocolos de cultivo (Mazón-Suástegui 2005; Abasolo-Pacheco *et al.*, 2009). Recientemente se han realizado trabajos sobre la influencia de la temperatura y presencia de depredadores sobre el crecimiento, supervivencia y energía para la reproducción (Guerra *et al.*, 2012a), la acumulación de toxinas (Escobedo-Lozano *et al.*, 2012), los cambios en los parámetros de estrés oxidativo (Guerra *et al.*, 2012b, 2013) y el reclutamiento de larvas en colectores artificiales en el Golfo de California (Soria *et al.*, 2013).

La almeja mano de león *N. subnodosus* (Sowerby I, 1835) posee un potencial que se ha determinado principalmente por el alto valor comercial de su músculo aductor (callo) en el mercado gourmet internacional, ya que es de gran tamaño (50-200 g), tiene buen sabor (Peña, 2001) y alcanza un alto precio en los mercados nacionales que oscilaron entre MXN\$80-150 kg<sup>-1</sup> (Osuna-García, 2008), así como por el uso de la concha para actividades artesanales. En este sentido, se ha visto que se pueden obtener perlas esféricas de naturaleza porcelanizada de esta especie, con diversas coloraciones que van desde el morado, marrón, naranja, rosa y otras, haciendo atractiva a la especie para la formación de perlas no nacaradas (Bari *et al.*, 2010). Existen técnicas determinadas para la producción de *N. subnodosus*, primeramente la captación de juveniles silvestres que actualmente está limitada por la sobreexplotación del único banco natural ubicado en laguna Ojo de Liebre B.C.S. (Maeda-Martínez, 2008) Una alternativa es la producción de juveniles en el laboratorio, para la cual se han desarrollado zootecnias, prototipos y procedimientos *ad-hoc* en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S.C. (CIBNOR) susceptibles de ser escalados a nivel comercial (Mazón-Suástegui *et al.*, 2011). Igualmente, se han desarrollado proyectos de asesoría para la producción comercial de semillas y engorda a talla comercial, en vinculación con empresas como Marimex del Pacífico, que no se han mantenido constantes (Maeda-Martínez, 2008). La almeja Mano de León se distribuye desde laguna Ojo de Liebre, en la península de Baja California, México, hasta las costas de Perú (Keen, 1971). Existen

muchos estudios realizados con esta especie, entre los que destacan el efecto del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum* en juveniles (Estrada *et al.*, 2007), la respuesta y condición de las larvas cultivadas con diferentes fuentes de agua marina (Abasolo-Pacheco *et al.*, 2009), la actividad de la enzima superóxido dismutasa en juveniles cultivados en laboratorio y expuestos al dinoflagelado tóxico *Prorocentrum lima* (Campa-Córdova *et al.*, 2009b). Se han abordado también estudios sobre la respuesta inmune de organismos adultos de la especie ante un reto con *V. alginolyticus* (Ramírez-Castillo *et al.*, 2011) y la utilidad de diferentes probióticos experimentales y comerciales en el crecimiento, supervivencia y producción de enzimas relacionadas con el sistema inmune de la especie (Granados-Amores *et al.*, 2012). Recientemente se evaluó el efecto combinado de la temperatura y la dieta en el crecimiento, supervivencia y composición bioquímica de semillas de *N. subnodosus* cultivadas en el laboratorio (Saucedo *et al.*, 2013).



**Figura 2.**– Anatomía externa de la almeja Catarina (*A. ventricosus*) y de la almeja mano de león (*N. subnodosus*). Fuente: Guido T. Poppe & Philippe Poppe - Conchology, Inc. ([www.conchology.be](http://www.conchology.be)).

### 2.1.3 Ostras perleras

La concha nácar *P. sterna* (Gould, 1851) (Figura 3) es una de las especies de ostras perleras que puede ser aprovechada de manera integral y generar productos de alto valor agregado como las perlas (medias perlas y perlas esféricas), la concha (actividad artesanal, botones), el nácar (industria cosmética y farmacéutica) y el callo (alimentación) (Monteforte, 1996; Saucedo, 2001). La concha nácar en particular se distribuye desde la costa de California hacia el sur hasta las costas de Perú, pasando por el Golfo de California (Keen, 1971). Entre los trabajos más recientes destacan los de fisiología reproductiva (Vite-García y Saucedo, 2008; Cáceres-Puig *et al.*, 2009), uso de calceína para estimar y validar la edad en juveniles (Cáceres-Puig *et al.*, 2011), la evaluación de los nutrientes asociados a la calidad de la gónada y la reproducción exitosa de la especie (Gómez-Robles *et al.*, 2013), el uso de ácidos grasos en la gónada y la glándula digestiva de machos y hembras durante su temporada de maduración natural (Hawkyns-Martínez *et al.*, 2014), y finalmente los patrones de crecimiento y reproducción para evaluar el posible cultivo de perlas en la bahía de Acapulco (Serna-Gallo *et al.*, 2014).



**Figura 3.**– Anatomía externa de la concha nácar (*P. sterna*). Fuente: Seashells Collection (<http://www.idscaro.net>).

## **2.2 Uso de probióticos en la acuicultura: Definición, modos de acción y selección.**

La definición original de probióticos fue acuñada por Lilly y Stillwell (1965) para referirse a “aquellas sustancias producidas por los microorganismos que estimulan el crecimiento de otro organismo”. Posteriormente Parker (1974) los refirió como “organismos y sustancias que contribuyen al balance intestinal microbiano”. La definición fue entonces limitada a “todo aquel microorganismo vivo que funciona como un complemento alimenticio para beneficiar a los organismos hospederos por traer consigo un balance intestinal microbiano” (Fuller, 1989, 1992). Sin embargo, esta definición fue aplicada para animales de granja o para humanos únicamente, por lo que su aplicación para acuicultura requiere algunas consideraciones adicionales. En este sentido, Gatesoupe (1999) redefinió el concepto de probióticos para acuicultura como “células microbianas vivas que son administradas con el fin de colonizar el tracto digestivo del hospedero mejorando la salud del mismo”. Así mismo, Verschuere *et al.*, (2000) definieron a los probióticos como “organismos vivos que tienen un efecto benéfico en el huésped mediante la modificación de la comunidad microbiana asociada a éste, a través de una mejora en el uso del alimento o su valor nutricional, mediante el incremento de la respuesta del huésped a las enfermedades, o a través del mejoramiento de la calidad de su ambiente”. Otra definición de probióticos los refiere como “microorganismos vivos que al ser administrados a un huésped en cantidades adecuadas le confieren un efecto benéfico a la salud” (FAO, 2006).

El principal propósito inicial del uso de probióticos es mantener o restablecer una relación favorable entre los microorganismos benéficos y los patógenos que constituyen la microbiota digestiva de los hospederos. El mecanismo de acción de un probiótico (Figura 4) incluye la competencia, al excluir bacterias patógenas o producir sustancias bactericidas o bacteriostáticas que inhiben el crecimiento de

bacterias patógenas. Este efecto antibacterial en el hospedero se puede lograr suministrando bacterias específicas con una acción individual o mezclas de bacterias que presentan una acción sinérgica. En ambos casos el mecanismo de acción incluye la producción de antibióticos, bacteriocinas, sideróforos, proteasas, peróxido de hidrógeno, así como la alteración del pH del TGI por la producción de ácidos orgánicos (Sugita *et al.*, 1997). En el caso particular de las bacterias ácido lácticas (BALs), ampliamente usadas como probióticos (ver Dosta *et al.*, 2009), se sabe que son productoras de bacteriocinas que inhiben el crecimiento de otros microorganismos. Las bacteriocinas son de gran interés ya que tienen un estatus de QPS (*qualified presumption of safety*), es decir, seguros para la salud.

Otro de los mecanismos para prevenir la colonización del hospedero por diversos patógenos, se asocia a una competencia por sitios de adhesión en los epitelios del TGI, la cual puede ser no específica y basada en factores fisicoquímicos, o específica e involucrando moléculas de adhesión en la superficie de la bacteria y moléculas receptoras en las células del epitelio (ver Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). Vine *et al.*, (2004) demostraron la exclusión competitiva de cinco cepas probióticas contra dos patógenos en la mucosa intestinal de peces, encontrando que uno de las cepas probióticas impide la adhesión del patógeno a la mucosa intestinal de peces. Es importante tener cuidado con la interpretación de resultados de pruebas de adhesión *in vitro* e *in vivo* ya que se ha reportado en algunos trabajos que el efecto puede tener resultados opuestos (Hansen y Olafsen, 1999). La competencia puede darse también por nutrientes, por ejemplo la competencia por el hierro entre los microorganismos ha sido reportado como un importante factor en las bacterias marinas (Verschuere *et al.*, 2000). Todos los microorganismos necesitan el hierro para crecer (Reid *et al.*, 1993) y generalmente está limitado en los fluidos de los tejidos de los organismos y de forma insoluble  $Fe^{3+}$  (Verschuere *et al.*, 2000). Los sideróforos son compuestos quelantes de hierro secretados por microorganismos, incluyendo los patógenos (Gram *et al.*, 1999), que pueden disolver hierro y hacerlo disponible para el crecimiento microbiano. Por lo

que, las bacterias probióticas productoras de sideróforos podrían ser utilizadas para competir por el hierro con los patógenos (Gatesoupe, 1997).

Un tercer mecanismo de acción de los probióticos es aportando nutrientes esenciales para optimizar los procesos de nutrición del hospedero, así como enzimas digestivas como amilasas, proteasas, lipasas y celulasas para mejorar sus procesos digestivos (Prieur *et al.*, 1990) además de nutrientes esenciales como vitaminas (Sugita *et al.*, 1992) y ácidos grasos esenciales (Vine *et al.*, 2006), además de enzimas intracelulares que son liberadas por autólisis al morir la célula probiótica (Mathur y Singh, 2005). En este sentido, el género *Bacillus* ha demostrado ser productor de sustancias que mejoran la absorción de nutrientes, incrementan los niveles de proteínas y mejoran el crecimiento en diferentes organismos en la acuicultura (ver Nemutanzhela *et al.*, 2014). Bairagi *et al.* (2002) demostraron que algunas cepas probióticas de *Bacillus* spp. indujeron el crecimiento y el contenido de proteínas en peces (*Labeo rohita*), atribuyéndolo a la producción de enzimas extracelulares como las celulasas y amilasas.

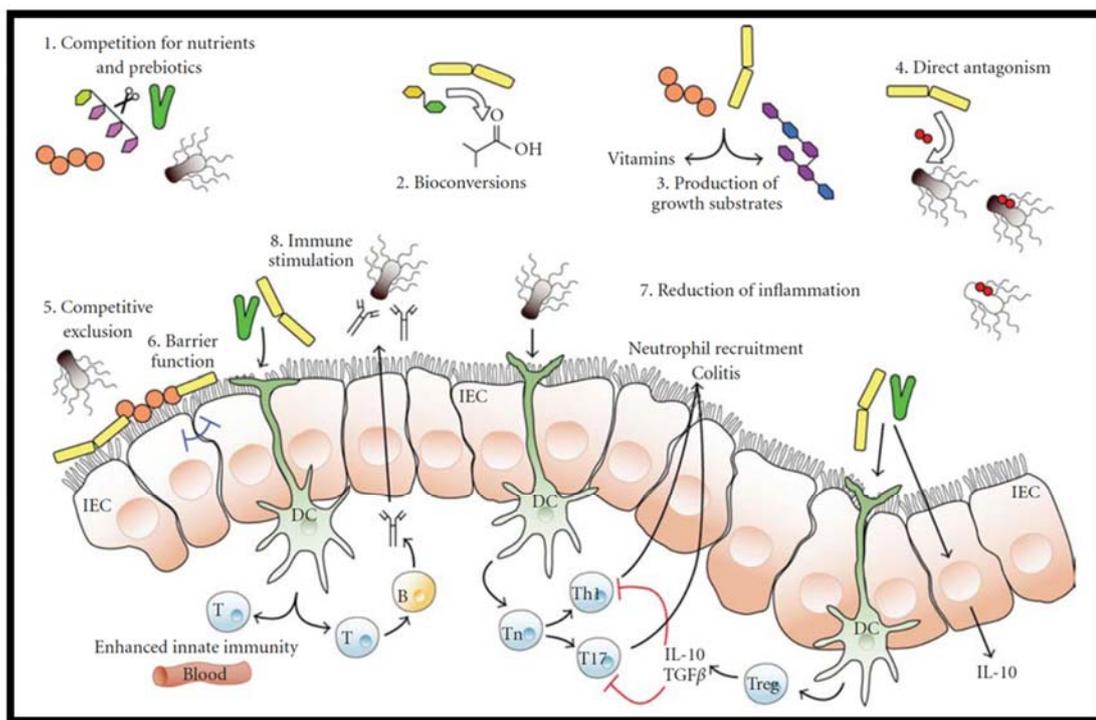
En cuarto lugar, los probióticos refuerzan el sistema inmune del huésped mediante la secreción de compuestos químicos que activan su sistema inmune y estimulan la respuesta defensiva ante virus, bacterias y parásitos que provocan enfermedades. Muchos probióticos han sido identificados por su acción inmunomoduladora, al mejorar la actividad fagocítica, el estallido respiratorio y la actividad superóxido dismutasa y peroxidasa, además de incrementar el número de leucocitos, linfocitos y eritrocitos en vertebrados (ver Newaj-Fyzul *et al.*, 2014).

Los moluscos poseen un sistema inmune constituido por células de la hemolinfa (hemocitos) y proteínas plasmáticas. Sus reacciones involucran componentes celulares y humorales encargados de la defensa para el rechazo de agentes externos y acciones nocivas del medio ambiente (Vargas y Barracco, 2001). Una vez activados los mecanismos de defensa, la respuesta es proporcional al estímulo y se expresa mediante la producción de enzimas antioxidantes y de la

hemolinfa, junto a hemocitos circulantes que se encargan de fagocitar material extraño (Roch, 1999). En camarones se ha descrito el efecto de cepas probióticas mediante cambios en la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la fenoloxidasa (Wang y Gu, 2010). En moluscos bivalvos se ha descrito la actividad de la SOD en juveniles de *C. corteziensis* tratados con probióticos (Campa-Córdova *et al.*, 2009). En larvas de *Pecten maximus* tratadas con la cepa probiótica X34 (*Phaeobacter gallaeciensis*) se reporta la activación de dos enzimas antioxidantes (catalasa y SOD) durante un reto con *Vibrio pectenicida* (Genard *et al.*, 2014).

Finalmente, algunas especies de bacterias probióticas descomponen la materia orgánica o materiales tóxicos existentes en el ambiente, mejorando así la calidad del agua empleada en los sistemas de cultivo. Esto ocurre principalmente por la acción de especies del género *Bacillus* sp. los cuales convierten de manera eficiente la materia orgánica en CO<sub>2</sub> disminuyendo niveles tóxicos de amonio y nitritos que pueden ser mortales para los organismos marinos de cultivo (ver Nemutanzhela *et al.*, 2014).

La formulación de consorcios de bacterias con diferentes efectos probióticos suele tener un efecto sinérgico que incluye la inhibición de patógenos, la mejora en la absorción de nutrientes que resulta favorable para incrementar el crecimiento del hospedero, y un efecto biorremediador que mejora la calidad del agua, proporcionando efectos diversos de amplio espectro en un solo producto compuesto por varias cepas probióticas (Lallo *et al.*, 2007).



**Figura 4.**– Diagrama esquemático que ilustra los mecanismos potenciales por los cuales bacterias probióticas pueden impactar en la microbiota. Estos mecanismos incluyen (1) competencia por ingredientes de la dieta como substratos de crecimiento, (2) bioconversión de productos fermentados, por ejemplo, azúcares con propiedades inhibitorias, (3) producción de substratos de crecimiento, por ejemplo Exopolisacáridos o vitaminas, para el uso de otras bacterias, (4) antagonismo directo por bacteriocinas, (5) exclusión competitiva por los sitios de adhesión, (6) mejora de la función de barrera, (7) reducción de la inflamación, alterando así las propiedades intestinales para la colonización (8) estimulación de la respuesta inmune innata (por mecanismos desconocidos). IEC: células epiteliales, DC: células dendríticas, T: células T. O’Toole y Cooney, 2008).

El proceso de selección de cepas bacterianas con potencial probiótico para la acuicultura de bivalvos es complejo, ya que aún es escaso el conocimiento básico sobre la interacción de dichas bacterias con la microbiota natural del hospedero, sea residente o transitoria, que está presente en su TGI. La utilización de un buen grupo de probióticos es de gran importancia en la acuicultura y es de vital importancia su adecuada selección. Para esto se debe primero tener en cuenta la

fuelle de donde se aislarán los potenciales probióticos. En los primeros experimentos de incorporación de consorcios probióticos en alimentos para la acuicultura, se utilizaron preparaciones comerciales diseñadas para organismos de crianza terrestre (Gatesoupe, 2000). Se evaluaron cepas de *Bacillus toyoi*, encontrando que mejoraban la tasa de supervivencia de la anguila japonesa y la tasa de crecimiento del jurel (Kozasa, 1986), así como la tasa de crecimiento de larvas del pez plano *Pssetta máxima* conocido como rodaballo (Gatesoupe, 1989, 1990). El uso de bacterias ácido lácticas fue también eficiente para mejorar la producción de rotíferos y la tasa de crecimiento de larvas de lenguado (Gatesoupe *et al.*, 1991a; Gatesoupe 1991b; Planas *et al.*, 2004). Sin embargo la supervivencia de estas cepas comerciales en el TGI de peces es incierto, y solo algunas colonias de *Bacillus* sp. pudieron recuperarse de larvas de rodaballo (Gatesoupe, 1994). Por ello, los probióticos aislados del ambiente marino pueden ser más eficientes que aquellos productos comerciales (Gatesoupe, 2000). La búsqueda de estas bacterias con potencial probiótico se ha realizado a partir de diversas fuentes que incluyen agua, sedimentos, plancton, invertebrados (Lodeiros *et al.*, 1988; Marty y Martin, 1992; Austin *et al.*, 1995; Riquelme *et al.*, 1996, 1997; Castillo *et al.*, 2001; Avendaño-Herrera *et al.*, 2005), mucosa de la piel de peces, ceparios, productos comerciales y particularmente del tracto digestivo de animales acuáticos (ver. Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). Diversos estudios en organismos acuáticos han establecido que la microbiota asociada al TGI participa en varias funciones de nutrición y provisión de vitaminas al huésped y colabora en el mejoramiento del sistema de defensa previniendo la colonización de bacterias patógenas (Prieur *et al.*, 1990; Moriarty 1998). Otra fuente de cepas se puede obtener de colecciones de cultivos de bacterias y productos comerciales (ver. Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). Se ha sugerido que los agentes probióticos deben ser aislados preferentemente del TGI debido a que estas bacterias están adaptadas a tolerar condiciones extremas en el tracto digestivo, además de que poseen la habilidad de adherirse a la superficie intestinal (Caipang *et al.*, 2010). Las bacterias probióticas que se extraen más comúnmente del tracto digestivo de animales incluyen los géneros *Lactobacillus*,

*Bacillus*, *Bifidobacterium* y *Enterococcus*, (Ouweland *et al.*, 1999). En el caso de bivalvos marinos, por sus hábitos alimenticios filtradores, concentran una mayor carga de bacterias que otros invertebrados marinos (Prieur *et al.*, 1990; Araya *et al.*, 1999), por lo que representan una buena fuente para la búsqueda de bacterias con potencial probiótico. Por ejemplo, Campa-Córdova *et al.* (2009a, 2011) evaluaron una cepa aislada del TGI de *N. subnodosus* (NS61) y una mezcla de bacilos aislados del camarón *L. vannamei* (cepa YC58) y el ostión de placer *C. corteziensis* (cepa YO12-1) en larvas y juveniles también de *C. corteziensis*, reportando una mejora significativa en la supervivencia de larvas, y en el crecimiento y actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) de juveniles. Así mismo, Aguilar-Macías *et al.* (2010) y Granados-Amores *et al.* (2012) reportan el uso benéfico de cepas probióticas aisladas de bivalvos marinos en la acuicultura de bivalvos. Luis-Villaseñor *et al.* (2013) también reportan un incremento en la supervivencia, pero en de larvas del camarón *L. vannamei* con una cepa aislada del ostión *C. corteziensis* (cepa YO12-1) a dos concentraciones ( $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>). Recientemente, Sánchez-Ortiz *et al.* (2015) aislaron y seleccionaron la cepa *Bacillus subtilis* del TGI de la almeja pata de mula *Anadara tuberculosa*, reportando que esta bacteria tuvo un efecto benéfico sobre el crecimiento y respuesta inmune del camarón *L. vannamei* en concentraciones de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. También recientemente Luna-González *et al.* (2015) aislaron del TGI de *C. gigas*, *C. corteziensis* y *A. maura* bacterias con potencial probiótico para su uso con moluscos bivalvos, encontrando dos cepas potenciales: *Bacillus licheniformis* (BCR 4-3) y *Leuconostoc mesenteroides* (BALCR 5-2 y BALOR 2-3).

Durante el proceso de selección de microorganismos probióticos es necesario realizar una serie de bioensayos *in vitro* e *in vivo*. Un primer paso a seguir, y de uso muy común y eficiente, es retar *in vitro* a las cepas contra las cepas patógenas del hospedero, mediante pruebas sobre medios sólidos o líquidos, en donde se evalúa la capacidad de las cepas o de los productos extracelulares de éstas (metabolitos secundarios) para inhibir a las bacterias patógenas (Verschuere

*et al.*, 2000). Los primeros estudios con bacterias marinas productoras de sustancias antimicrobianas fueron realizados por Rosenfeld y Zobell, (1947). Desde entonces, la búsqueda, aislamiento y caracterización de bacterias nativas con actividad antagónica sobre microorganismos patógenos marinos y terrestres, se ha realizado en diversos hábitats como agua de mar, sedimentos, fitoplancton, vertebrados e invertebrados (Riquelme *et al.*, 1997). Aunque esta primera etapa de selección es efectiva, se debe tener cuidado ya que la ausencia de inhibición no es un criterio suficiente para descartar otras cepas como candidatas a probióticos (Verschuere *et al.*, 2000). Existen otros criterios que se deben tomar en cuenta como la adhesión al TGI (Balcázar *et al.*, 2006), la habilidad de los microorganismos para colonizar el tracto digestivo es considerada como uno de los principales criterios de selección de bacterias probióticas, ya que esta habilidad pretende reducir o prevenir la colonización de patógenos (Vine *et al.*, 2004). Los modelos *in vitro* para determinar la adhesión bacteriana son indispensables y nos ayudan a seleccionar cepas con potencial probiótico (Ouwehand y Salminen *et al.*, 2003). Otro de los criterios que se deben tomar en cuenta para la selección de cepas probióticas es que sean seguras tanto para el hospedero como para el consumidor final, es decir, no deben ser patogénicas, ya que algunas bacterias producen hemólisis, y las bacterias hemolíticas son capaces de sintetizar exotoxinas que provocan la lisis parcial o total de los eritrocitos de la sangre de diferentes animales (Zamora-Rodríguez, 2003), lo cual puede causar daño al hospedero y al consumidor final, por lo que es necesario realizar pruebas de actividad hemolítica. Adicionalmente se deben tomar en cuenta características como la producción de enzimas extracelulares y nutrientes por parte de las bacterias (ejemplo los *Bacillus* spp.). Se ha reportado que estas cepas producen enzimas como amilasas, proteasas y celulasas que mejoran la digestión y absorción de nutrientes (Kumar *et al.*, 2006), incrementando la tasa de crecimiento de los organismos marinos (Irianto y Austin, 2002).

Por otra parte, se deben realizar pruebas *in vivo* para determinar la viabilidad del probiótico, mediante bioensayos en las diferentes etapas del desarrollo de los

hospederos para evaluar su efecto sobre el crecimiento, supervivencia y respuesta inmune, así como en la calidad del agua de los cultivos (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). Una manera de evaluar el efecto probiótico sobre la respuesta inmune del hospedero es hacer bioensayos *in vivo* contra patógenos mediante infecciones experimentales conocidas como retos, con la finalidad de determinar la capacidad de la cepa probiótica de proteger a las hospederos, en donde los patógenos se pueden introducir por inmersión al agua de cultivo, por vía oral en el alimento o directamente en el organismo (Verschuere *et al.*, 2000).

### **2.3 Principales microorganismos usados como probióticos en la acuicultura**

Muchos organismos marinos que incluyen bacterias, hongos, bacteriófagos (Park *et al.*, 2000) y levaduras (Tovar *et al.*, 2002), son considerados como virtuales fuentes promisorias de sustancias bioactivas. Hallazgos de nuevos microorganismos marinos muestran la existencia de cepas nativas que producen una variedad de metabolitos secundarios química y biológicamente interesantes para el desarrollo y producción de nuevos compuestos de importancia en la industria farmacológica, cosmética, de suplementos nutricionales, agroquímicos, biológica, entre otras (León *et al.*, 2010). Las bacterias son uno de los grupos más usados como probióticos en la acuicultura (Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). La primera historia exitosa de selección de probióticos del medio acuático ha sido lograda con larvas de crustáceos; Nogami y Maeda (1992) aislaron una cepa bacteriana que reprime el crecimiento del patógeno *Vibrio* sp. e incrementa la producción de larvas del cangrejo *Portunus trituberculatus*. Las bacterias gram-negativas probióticas usadas en la acuicultura pertenecen generalmente a los géneros *Aeromonas* sp., *Alteromonas* sp., *Burkholderia* sp., *Enterobacter* sp., *Neptunomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Roseobacter* sp., *Shewanella* sp., *Synechococcus* sp., *Thalassobacter* sp., *Vibrio* sp. y *Zooshikella* sp. También bacterias gram-positivas son usadas como probióticos en la acuicultura y pertenecen a los géneros *Arthrobacter* sp., *Bacillus* sp., *Brevibacillus* sp., *Carnobacterium* sp., *Enterococcus* sp., *Lactobacillus* sp., *Lactococcus* sp., *Micrococcus* sp., *Rhodococcus* sp.,

*Streptococcus* sp., *Streptomyces* sp., *Vagococcus* sp. y *Weissella* sp. (Austin *et al.*, 1995; Verschuere *et al.*, 2000; Sullivan 2001; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014).

Los géneros más usados en la acuicultura son *Bacillus* sp. y *Lactobacillus* sp. Los primeros se caracterizan por formar esporas (Hong *et al.*, 2005), mejorar la absorción de alimentos en el hospedero, producir diversas enzimas extracelulares, mejorar la digestibilidad del alimento (Kumar *et al.*, 2006) y degradar la materia orgánica del ambiente mejorando la calidad de agua en los cultivos (Nimrat *et al.*, 2012). Una revisión más amplia del uso benéfico de este género en la acuicultura se puede consultar en Nemutanzhela *et al.* (2014). Por otro parte, las bacterias ácido lácticas (BAL), que incluyen al género *Lactobacillus* sp., se caracterizan por producir sustancias antimicrobianas que inhiben a las bacterias patógenas, por lo cual se proponen como agentes efectivos para el control biológico en la acuicultura (Gatesoupe 1999; Balcázar *et al.*, 2006). Esto debido a que este género mejora la respuesta inmune y la resistencia ante enfermedades por bacterias patógenas, incrementan la disponibilidad de nutrientes y el uso de algunos carbohidratos no digeribles (Fuller, 1989; Gatesoupe, 1991a). Este género se caracteriza también por no formar esporas, ser catalasa negativo, producir ácido láctico como producto principal de su metabolismo fermentativo, y habitar generalmente en el TGI de diversos organismos (Hassan y Frank, 2001). Las bacteriocinas producidas por las BAL son las que tienen un mayor interés, ya que tienen el estatus de QPS (*qualified presumption of safety*), por lo que son considerados como microorganismos seguros para la salud. Es importante mencionar que estos microorganismos son los más utilizados como probióticos en la acuicultura (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006), y existen numerosos trabajos en los que se han evaluado como probióticos en ese campo (ver Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). Por ejemplo *Lactobacillus acidophilus* fue evaluada en juveniles de la ostra perlera *P. margaritifera*, y se logró incrementar la supervivencia y mejorar el crecimiento en talla y peso, a comparación del grupo control que solo fue alimentado con la microalga *Chaetoceros calcitrans* (Subhash y Lipton, 2007). En juveniles de *C. corteziensis* se evaluó una cepa de *Lactobacillus*

sp. NS61 aislada de *N. subnodosus* y se incrementó significativamente el crecimiento con respecto al control (Campa-Córdova *et al.*, 2009a). Finalmente, con esta misma cepa (NS61) en concentraciones de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> se encontraron altos porcentajes de supervivencia, y mejoras en el crecimiento medido en talla y peso húmedo total en juveniles de *P. mazatlanica* (Aguilar-Macías *et al.*, 2010).

## **2.4 Evaluación de probióticos en la acuicultura de larvas y juveniles de bivalvos marinos**

Existen diversos trabajos y revisiones sobre la importancia y utilidad en el uso de los probióticos en la acuicultura (Gatesoupe, 1999; Verschuere *et al.*, 2000; Balcázar *et al.*, 2006; Vine *et al.*, 2006; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008; Prado *et al.*, 2010; Lara-Flores 2011; Singh *et al.*, 2013; Pandiyan *et al.*, 2013; Newaj-Fyzul *et al.*, 2014).

### **2.4.1 Larvas**

Una revisión enfocada únicamente al uso de probióticos en bivalvos marinos, particularmente en larvas, es reportado por Prado *et al.* (2010). Los autores describen su aplicación y modos de acción, y enfatizan en la necesidad de seguir trabajando con estos para encontrar una cepa, o mezcla de cepas, con actividad probiótica, capaces de ayudar a estabilizar la microbiota de las larvas.

Recientemente, Campa-Córdova *et al.* (2011) realizaron un trabajo para evaluar el efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión de placer *C. corteziensis*, utilizando como probióticos bacterias ácido lácticas (cepa NS61) aisladas de *N. subnodosus*, bacilos aislados de *L. vannamei* (*Pseudomonas aeruginosa*, cepa YC58) y de *C. corteziensis* (*Burkholderia cepacia*, cepa Y021). Las cepas se evaluaron por inmersión en cultivos larvarios de *C. corteziensis* a dos concentraciones diferentes, hasta completar el estadio pediveliger, encontrando

mayor supervivencia con las cepas ácido lácticas. Lim *et al.* (2011) y Kapareiko *et al.* (2011) realizaron estudios similares dirigidos a identificar una nueva bacteria probiótica (solo es referida como cepa OY15) aislada del TGI de organismos adultos de *Crassostrea virginica*, mostrando una significativa mejora en la supervivencia larval de la ostra *C. virginica* durante las dos primeras semanas de vida, que es donde la mortalidad es más alta. Se reporta también el efecto de protección de cuatro cepas probióticas (*Alteromonas macleodii* 0444, *Neptunomonas* sp. 0536, *Phaeobacter gallaeciensis* y *Pseudoaltermonas* sp. D41) en larvas de tres especies de bivalvos: *C. gigas*, *Ostrea edulis* y *Pecten maximus*, retadas contra cuatro cepas de patógenos: *V. coralliilyticus*, *V. pectenecida* y *V. splendidus* (Kesarcodei-Watson *et al.*, 2012a). Los autores concluyen que las cepas probióticas evaluadas fueron efectivas para las larvas de las tres especies, pero que funcionan de manera específica en cada una de ellas y para cada cepa patógena de *Vibrio* a la que fueron sometidas. Posteriormente, estos mismos autores reportan los hallazgos de dos cepas probióticas (*Alteromonas macleodii* 0444 y *Neptunomonas* sp. 0536) evaluadas a dos diferentes concentraciones y de manera individual y mezcladas sobre cultivos de larvas del mejillón *Perna canaliculus* (Kesarcodei-Watson *et al.*, 2012b). Se concluye que las altas concentraciones evaluadas provocaron menor crecimiento y una menor tasa de alimentación en larvas, comparado con el grupo control y con los tratamientos con menores concentraciones. Sin embargo, las concentraciones más altas protegieron a las larvas contra bacterias patógenas del género *Vibrio* en un reto experimental. Karim *et al.* (2013) aislaron dos cepas como probióticos a partir de organismos y sedimentos marinos, la cepa S4 identificada como *Phaeobacter* sp. y la cepa RI06-95 identificada como *B. pumilus*; estas se evaluaron en larvas del ostión *C. virginica* y encontraron que con un pre-tratamiento de estas cepas durante 24 horas a concentraciones de  $10^2$ - $10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> confiere protección en un reto contra *V. tubiashii* y *Roseovarius crassostreae*, cepas patógenas que causan severas mortalidades en larvas de esta especie. También en larvas de *P. maximus* se demostró el efecto protector de la cepa probiótica X34 que se identificó como *Phaeobacter pallaeciensis* ante el ataque del patógeno *V.*

*pectenicida* (Genard *et al.*, 2014). También en larvas de *P. maximus*, Kesarcodi-Watson *et al.* (2014) evaluaron las cepas probióticas *P. gallaeciensis*, *A. macleodii* 0444 y *Neptunomonas* sp. 0536, en un reto contra *V. pectenica*, demostrando que las cepas fueron más efectivas en forma combinada debido a la sinergia, que de manera individual.

#### 2.4.2 Juveniles

En juveniles de moluscos bivalvos, son aún menos los trabajos realizados sobre el efecto de los probióticos. Subhash y Lipton (2007) demostraron el efecto probiótico de la bacteria *L. acidophilus* en el crecimiento y supervivencia de juveniles de la ostra perlera *P. margaritifera*. Campa-Córdova *et al.* (2009a) evaluaron tres cepas probióticas (*Lactobacillus* sp. aislada de *N. subnodosus* y una mezcla de los bacilos *Pseudomonas* sp. aislada de *L. vannamei* y *B. cepacia* aislada de *C. corteziensis*), en juveniles de *C. corteziensis* para determinar su efecto en el crecimiento, supervivencia y actividad la enzima SOD. Los autores reportan un crecimiento significativo con *Lactobacillus* sp. y un incremento significativo en supervivencia y actividad SOD con la mezcla de bacilos, concluyendo que la microbiota benéfica aislada de invertebrados marinos mejoran el cultivo de juveniles de *C. corteziensis*. Aguilar-Macías *et al.* (2010) realizaron un trabajo para mejorar la respuesta y condición de juveniles de *P. mazatlanica* producidas en el laboratorio, empleando diferentes tipos de probióticos; una mezcla de dos cepas: *B. cepacia* y *P. aeruginosa*, *Lactobacillus* sp., una levadura marina *Yarrowia lipolytica*, un probiótico comerciales (EPICIN®), y un antibiótico oxitetraciclina. Se encontró que *Lactobacillus* sp. incrementó significativamente el crecimiento y supervivencia de los juveniles de la ostra perlera, en comparación con aquellos tratados con EPICIN, oxitetraciclina y la mezcla de cepas, en donde el crecimiento fue mas lento y la supervivencia más baja. Más recientemente, Granados-Amores *et al.* (2012) evaluaron el crecimiento, supervivencia y actividad de la SOD en juveniles de *N. subnodosus* tratados con la mezcla de las cepas probióticas *B. cepacia* y *P. aeruginosa*, y los probióticos comerciales EPICIN® y BACTOSAFE®. Los autores

concluyen que los probióticos comerciales presentaron mejores índices de rendimiento en los juveniles tratados, por lo contrario las cepas probióticas seleccionadas presentaron menor crecimiento posiblemente por las altas concentraciones utilizadas. Finalmente, se reporta el efecto de protección en juveniles de *C. virginica* con las cepas probióticas S4 identificada como *Phaeobacter* sp. y la cepa RI06-95 identificada como *B. pumilus*, en un reto con los patógenos *V. tubiashii* y *Roseovarius crassostreae* (Karim *et al.*, 2013).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La producción de larvas de moluscos bivalvos es el cuello de botella más importante para la producción sostenida y suficiente a nivel comercial en México. Esto sucede, entre otras cosas, por enfermedades microbianas como la vibriosis principalmente, que es causada por bacterias patógenas del género *Vibrio*. Estos brotes infecciosos afectan etapas críticas del desarrollo ontogenético, particularmente el inicio de la alimentación exógena por parte de las larvas veliger tempranas y la metamorfosis de las larvas pediveliger tardías (postlarvas o juveniles) causando altas mortalidades y discontinuidad en la producción al sector comercial. Adicionalmente a esta problemática, el uso de antibióticos debe ser eliminado totalmente debido a diversos problemas que causan en la acuicultura como lo son la resistencia bacteriana y la contaminación por el desecho inseguro de agua con estas sustancias. La acción de los probióticos es compleja y aun es necesario entender la relación bacteria-hospedero para así poder establecer protocolos de aplicación que mejoren los niveles productivos en las diferentes especies de bivalvos, teniendo en cuenta factores como etapas de cultivo y dosis de administración/dosificación. Por ello, el presente trabajo tiene como objetivo seleccionar *in vitro* bacterias con potencial probiótico y validarlas en cultivos intensivos experimentales de larvas y juveniles de especies de bivalvos marinos de interés comercial en la acuicultura en México.

#### 4. HIPÓTESIS

Las bacterias aisladas del TGI de *N. subnodosus* y *P. sterna* seleccionadas *in vitro* presentan características probióticas deseables para la acuicultura.

Predicciones:

- Presentarán inhibición *in vitro* contra patógenos *Vibrio* spp.
- Favorecerán las tasas de supervivencia, crecimiento, fijación de bivalvos marinos, así como la protección en retos contra vibrios patógenos.
- Conferirán beneficios específicos a cada especie de bivalvo, así como a cada estadio de desarrollo evaluado.
- Conferirán mayores beneficios a las larvas y juveniles cultivados al ser administradas de manera combinada, en comparación con las cepas administradas de forma individual.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto de bacterias benéficas aisladas del TGI de *Nodipecten subnodosus* y *Pteria sterna* y su efecto *in vivo* en el cultivo de dos especies de bivalvos marinos de interés comercial.

#### 5.1.1 Objetivos específicos

- Aislar, seleccionar e identificar bacterias con potencial probiótico asociadas al TGI de los bivalvos *N. subnodosus* y *P. sterna*, mediante pruebas *in vitro*.
- Evaluar el efecto de las bacterias seleccionadas, suministradas de forma individual y combinadas, sobre el crecimiento, supervivencia y composición bioquímica de juveniles de *C. sikamea*.
- Evaluar el efecto de las bacterias seleccionadas, suministradas de forma individual y combinadas, sobre el crecimiento, supervivencia y fijación de larvas de la almeja Catarina *A. ventricosus*.
- Evaluar el efecto de las bacterias seleccionadas, suministradas de forma individual y combinadas, sobre el crecimiento, supervivencia y composición bioquímica de juveniles de *A. ventricosus*.
- Evaluar el grado de protección (supervivencia y actividad de la enzima antioxidante SOD) de las cepas probióticas seleccionadas en juveniles de *A. ventricosus* durante un reto con el patógeno *V. alginolyticus*.

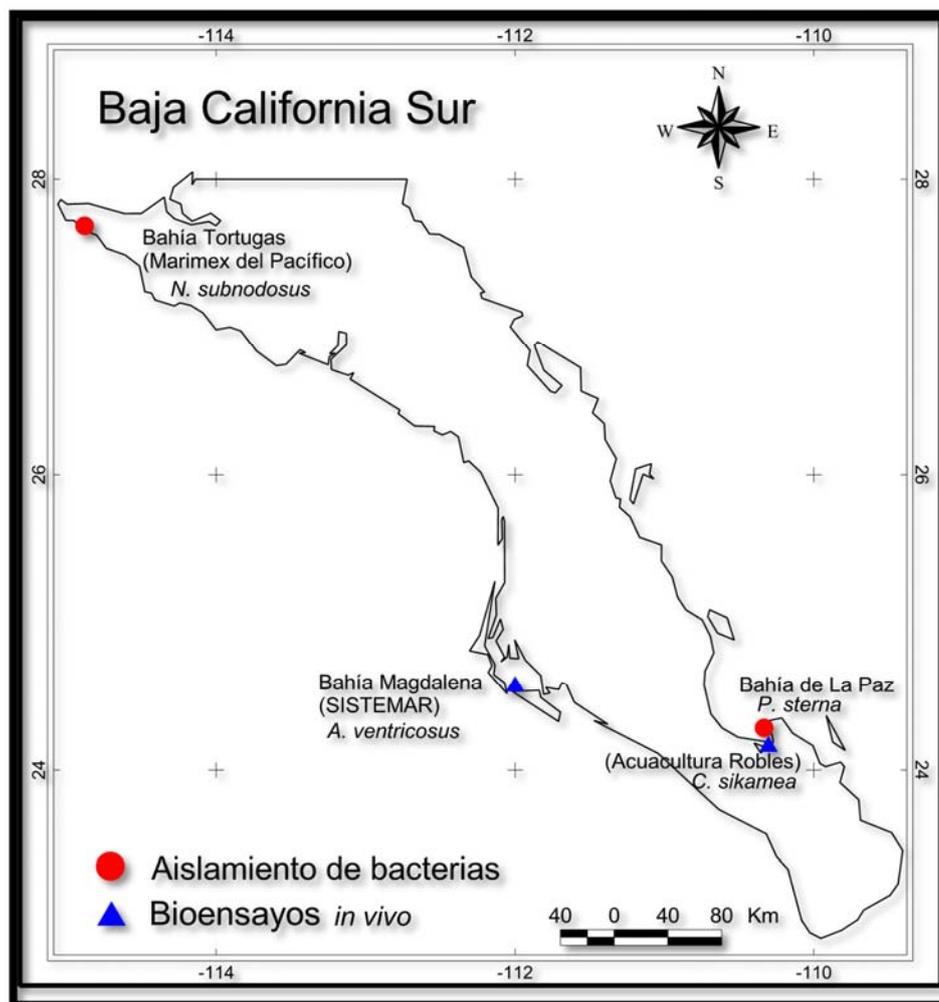
## **6. MATERIALES Y MÉTODOS**

Se realizó la selección *in vitro* de cepas de bacterias con potencial probiótico, las cuales se aislaron del TGI de *N. subnodosus* y *P. sterna* y posteriormente se evaluaron de forma individual y combinada en cultivos intensivos de larvas y juveniles de otras especies de bivalvos de interés comercial. Para ello, la metodología se dividió en dos partes generales: PARTE I. (Bioensayos *in vitro*) y PARTE II (Validación de cepas en bioensayos *in vivo*).

### **6.1 PARTE I. Bioensayos *in vitro*: Aislamiento, caracterización y selección de cepas con potencial probiótico**

#### **6.1.1 Obtención de organismos**

Se obtuvieron 20 organismos adultos ( $62.90 \pm 3.24$  mm) de un cultivo comercial de mano de león, *N. subnodosus*, ubicado en Bahía Tortugas, B.C.S, México (27°41'N, 114°53'O). Los organismos se encontraban en sistemas de cultivo tipo linternas, suspendidas en "long-lines" a 12 m de profundidad. Los organismos fueron donados por la empresa *Marimex del Pacífico*, S.A. de C.V. Por otro lado se obtuvieron 20 organismos adultos silvestres ( $87.18 \pm 2.03$  mm), mediante buceo autónomo, de concha nácar *P. sterna* en la Caleta El Merito, en Puerto Pichilingue, Bahía de La Paz, B.C.S., México (24°17'N, 110°20'O) (Figura 5).



**Figura 5.-** Área de toma de organismos para: (1) el aislamiento y selección de bacterias probióticas y (2) validar las cepas probióticas *in vivo* en cultivos intensivos experimentales.

### 6.1.2 Toma de muestras del TGI

Antes de realizar la disección, los organismos de cada especie fueron depurados por 72 h (Lee *et al.*, 2010a) para asegurar lo mayor posible el aislamiento de la microbiota residente del TGI de los organismos. Posteriormente se realizó la disección de los organismos bajo condiciones asépticas para extraer el TGI (Figura

6). Finalmente se hizo un homogenizado y macerado de los organismos, por especie, con ayuda de un homogeneizador de motor inalámbrico para tejido (Cat. #431-0100; VWR, Radnor, PA, E.U.A.) con pistilos de un solo uso (Cat. #431-0094; VWR) y tubos tipo eppendorf de 1.5 mL (Cat. #431-0096; VWR).



**Figura 6.**– Toma de muestra del tracto gastrointestinal (TGI) de *N. subnodosus* (almeja mano de león) y *P. sterna* (concha nácar)

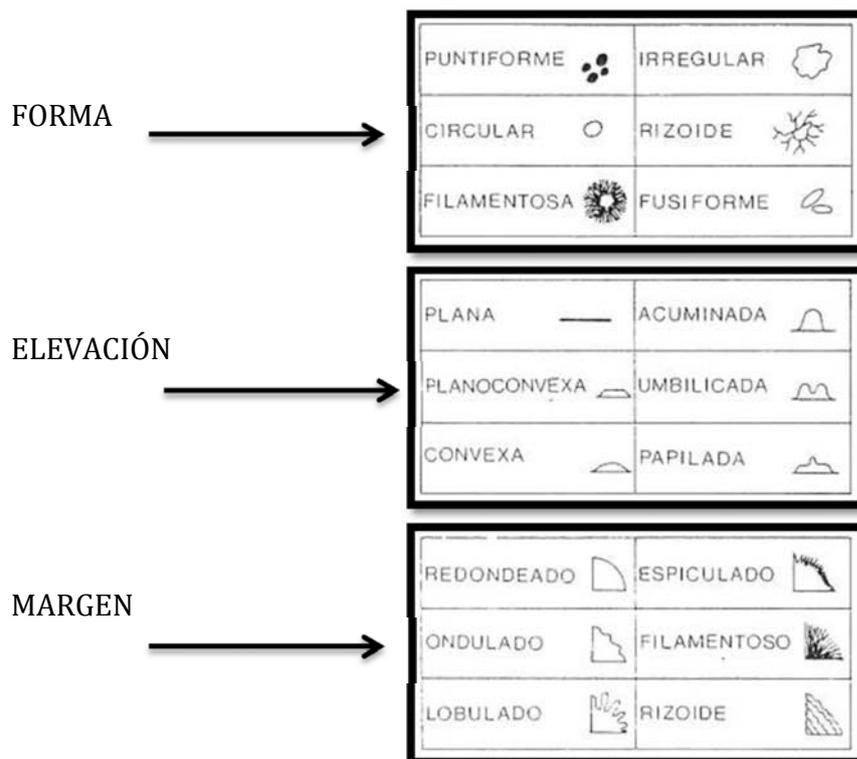
### 6.1.3 Aislamiento de bacterias

Se tomó 1 mL del homogenizado (solución stock) y se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) en tubos tipo Falcon estériles con solución salina estéril al 2%. Posteriormente se diseminaron alícuotas de 0.1 mL de las diluciones y la solución stock, por duplicado, y se realizó la siembra por el método de dispersión sobre la superficie de placas Petri, previamente rotuladas y preparadas con los siguientes medios de cultivo: Agar marino 2216 (#212185 Difco, BD & Co., Franklin Lakes, NJ, E.U.A), Agar Man, Rogosa y Sharp (MRS) (Cat. #288210; Difco, BD & Co., Franklin Lakes, NJ, E.U.A) y Agar Rogosa (Cat. #248020; Difco, BD & Co.), estos tres últimos adicionados con 2% de NaCl (Cat. #24902; Fermont, E.U.A.). Las placas se incubaron a 35°C durante 24 h. Para el caso de bacterias anaerobias, la incubación se realizó en jarras de anaerobiosis con el sistema GASPAC (BBL), a 35°C por un tiempo de entre 48-72 h. Adicionalmente se tomó una parte de la solución stock y se colocó en tubos Falcon de 15 mL y se incubaron a 100°C por 10

min, con la finalidad de eliminar células vegetativas bacterianas y dejar aquellas que formen esporas, como los *Bacillus* sp. Después del tiempo de incubación se tomaron alícuotas de 0.1 mL y se sembraron por el método de dispersión, mientras que otra muestra se sembró por el método de estría cruzada, ambos en medio Tripticasa Soya Agar (TSA) (Cat. #210800, BD-Bioxon, Franklin Lakes, NJ, E.U.A), adicionado con 2% de NaCl. Posteriormente se incubaron a 35°C por 24 h.

#### **6.1.4 Purificación de bacterias**

La purificación de las cepas se llevó a cabo de acuerdo a la morfología externa de las colonias, tomando en cuenta el tamaño: grande (diámetro mayor a 1 mm), mediana (aprox. igual a 1 mm) y pequeña (menor a 1 mm), color, superficie (brillante, lisa, granular, rugosa), consistencia (viscosa, mantecosa), densidad (opaca, transparente), forma, elevación y margen (Figura 7). Esto se realizó mediante el método de estría cruzada. Las cepas aisladas se conservaron en tubos criogénicos con caldos MRS y Tripticasa Soya Caldo (TSC) (Cat. #211670, BD-Bioxon, Franklin Lakes, NJ, E.U.A), según el caso, adicionados con glicerol al 30% como crioprotector. Los tubos se preservaron en cajas criogénicas a -80°C para su uso posterior.



**Figura 7.-** Purificación de cepas de acuerdo a su morfología colonial.

### 6.1.5 Actividad hemolítica en eritrocitos de las bacterias aisladas

Para determinar la actividad hemolítica de las bacterias aisladas se utilizó agar base sangre (Cat. # 211728, BD-Bioxon, E.U.A.), adicionado con 5% de sangre humana y 2% de NaCl. Cada cepa bacteriana se inoculó en cajas Petri preparadas con agar sangre e incubadas a 35°C por 24-48 h. en condiciones anaerobias y aerobias, de acuerdo a los requerimientos de cada bacteria. Los resultados se ordenaron de acuerdo al patrón de hemólisis detallado en la Tabla I.

**Tabla I.**– Patrón de hemólisis descrito por Koneman *et al.* (2001).

TIPO	HEMOLISIS	CARACTERISTICAS
1. Alfa ( $\alpha$ )	Incompleta, pigmento verde	Se deduce a partir de una zona parda a verdosa alrededor de las colonias
2. Beta ( $\beta$ )	Completa, pigmento blanco	Las bacterias sintetizan una hemolisina que origina una zona de lisis transparente alrededor de las mismas
3. Gama ( $\gamma$ )	Sin hemolisis	Algunas bacterias crecen en agar sangre sin producir ningún cambio en los glóbulos rojos
4. No hemólisis	Sin crecimiento	Algunas especies bacterianas no son capaces de crecer en este medio enriquecido

#### 6.1.6 Actividad hemolítica en hemocitos de las bacterias aisladas

La actividad hemolítica en hemocitos de ambas especies de bivalvos se realizó adaptando la metodología descrita por Chin *et al.* (2000) a partir de 5 organismos adultos depurados en agua de mar estéril durante 72 h. Se extrajeron muestras de 1 mL de hemolinfa con jeringas para insulina estériles, e inmediatamente se transfirieron a tubos eppendorf con 133  $\mu$ L (3% p/v) del colorante Rosa de Bengala (Cat. #R4507, Sigma St. Louis, MO) para teñir los hemocitos. El contenido de cada tubo se mezcló con 15 mL de un medio agar basal: 10 g L<sup>-1</sup> bacto peptona (Cat. #211677, Difco, BD & Co, Franklin Lakes, NJ E.U.A), 5 g L<sup>-1</sup> de NaCl y 15 g L<sup>-1</sup> de bacto agar (Cat. #214050, Difco, BD & Co, Franklin Lakes, NJ E.U.A), se enfrió a 45-50°C, y posteriormente se vació en placa Petri. Las placas se inocularon e incubaron por 24 h a 35°C. La actividad hemolítica se detectó mediante la medición del diámetro de los halos claros alrededor de las colonias.

## **6.1.7 Selección de bacterias con actividad antagónica a vibrios**

### **6.1.7.1 Preparación del inóculo de bacterias prueba**

Para preparar el inóculo se reactivaron las cepas prueba en TSC y caldo MRS, según correspondía, adicionando 2% de NaCl. Para ello se tomaron al menos de 3 a 5 colonias bien aisladas y purificadas, se transfirieron a tubos Falcon de 15 mL con 6 mL del caldo de cultivo y se incubaron a 35°C por 24-48 h bajo condiciones aeróbicas. Posteriormente se tomó 1 mL del cultivo y se determinó su densidad óptica a 540 nm en un espectrofotómetro, la cual se ajustó a 1 para obtener una concentración aproximada final de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>.

### **6.1.7.2 Preparación del inóculo de vibrios**

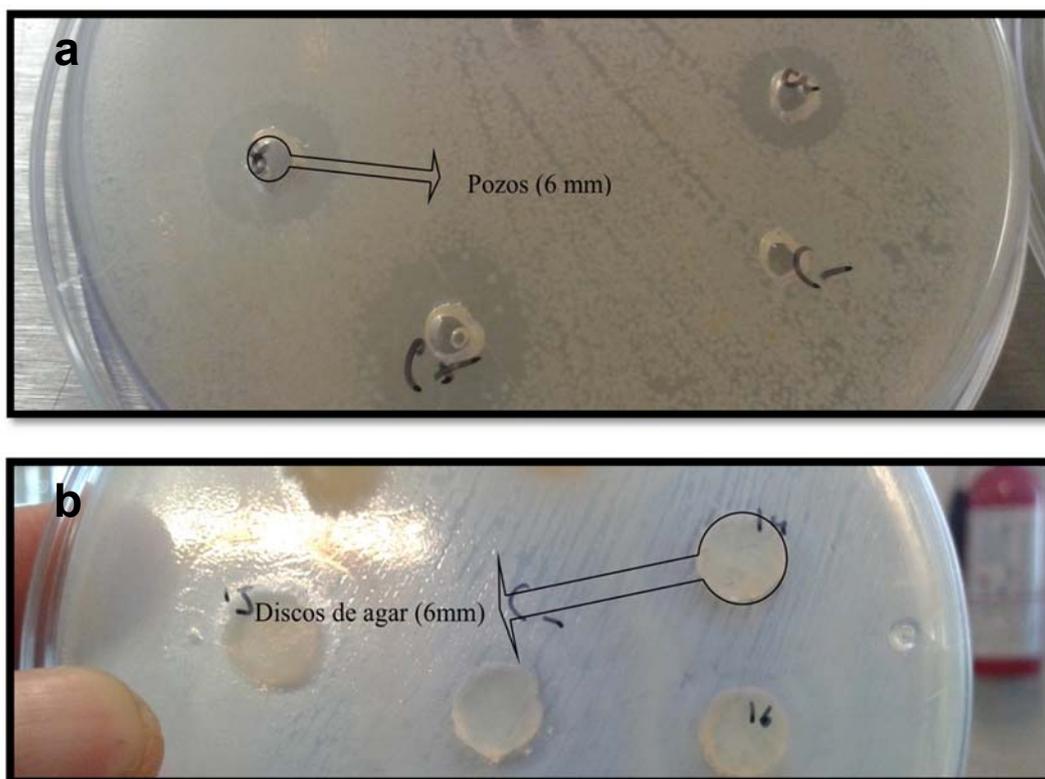
Los cuatro vibrios seleccionados (*V. alginolyticus* CAIM 57, *V. harveyi* CAIM 1793, *V. vulnificus* CAIM 157 y *V. parahaemolyticus* ATCC 17802) se prepararon de acuerdo a la metodología antes mencionada (sección 6.1.7.1) en el medio de cultivo TSC. Las cepas de referencia se tomaron de CAIM (Colección de Microorganismos de Importancia Acuática; [www.ciad.mx/caim](http://www.ciad.mx/caim)) y ATCC (American Type Culture Collection; <http://www.atcc.org>). La actividad inhibitoria de las cepas aisladas fue realizada por dos métodos (Figura 8): discos de agar (Método 1) y método del sobrenadante en pocillos (Método 2), según Yuan-Kun (2006). El primer método consiste en inocular las cepas aisladas sobre toda la superficie de las placas de agar TSA y MRS. Después de ser incubadas, durante su fase exponencial, se extrajeron discos de agar de 6 mm de diámetro y se colocaron sobre la superficie de cajas petri preparadas con Agar Marino (Cat. #2216 Difco; BD & Co., Franklin Lakes, NJ E.U.A), previamente inoculado con 100 µL de las cepas patógenas. Las placas se incubaron por 48 h a 35°C. Adicionalmente, se utilizó el método 2 (pocillos) con la finalidad de evaluar la inhibición de los patógenos debido al metabolito secretado por las cepas bacterianas, y en ausencia de las células bacterianas. Para

ello, se realizó un frotis del inóculo de *Vibrio* sobre cada una de las superficies de placas de agar marino. Posteriormente se hicieron perforaciones de 6 mm de diámetro en las placas y con pipetas de transferencia estériles se sellaron los pozos con 10  $\mu\text{L}$  de agar para que no se difundiera por la parte inferior de la placa. Previamente las células de las cepas prueba fueron centrifugadas a  $4696 \times g$  durante 10 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se adicionaron a cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  del sobrenadante obtenido de cada cepa prueba. Después de 15 min de reposo se incubaron las placas a  $35^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Ambas metodologías se realizaron por triplicado, utilizando como control positivo el antibiótico oxitetraciclina ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ) y como control negativo el mismo medio de cultivo. Se midió el diámetro del halo de inhibición formado alrededor de las cepas de prueba, considerándose positiva la prueba al obtener halos mayores a 5mm y se compararon estadísticamente las dos metodologías propuestas. Adicionalmente se calculó el porcentaje del efecto inhibitorio relativo (Martínez *et al.*, 1996) respecto al control positivo, aplicando la expresión:

$$(1) \text{ Efecto inhibitorio (\%)} = \frac{(\text{Medida dhi})}{(\text{dhi control positivo})} \times 100$$

Donde:

*dhi* = diámetro halo de inhibición



**Figura 8.**– Metodologías para evaluar el antagonismo de las cepas seleccionadas a *Vibrio* spp. (a) Método 1: Discos de agar; (b) Método 2: Sobrenadante en pocillos.

### 6.1.8 Enzimas extracelulares

#### 6.1.8.1 Hidrólisis de caseína y gelatina (producción de proteasas)

La primera enzima se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Prescott (2002). Para ello, las cepas bacterianas se sembraron en un medio con caseína que constó de dos fracciones: (1) TSA adicionado con 2% de NaCl (20 g en 250 mL de agua destilada) y (2) Leche descremada (10 g en 250 mL de agua destilada). Cada fracción se esterilizó por separado. La solución de caseína se esterilizó a 115°C durante 15 min. Posteriormente se dejaron enfriar hasta 45°C, se mezcló y se repartió el medio en cajas de Petri. Las cepas se sembraron colocando

un punto del cultivo en el agar y se incubaron durante 3 días a 35°C. La lectura de la prueba se realizó observando la aparición de un halo transparente alrededor del crecimiento bacteriano, que es cuando la bacteria es capaz de hidrolizar la caseína y cuando finalmente se midió el halo de inhibición.

Por otro lado, la hidrólisis de la gelatina se determinó de acuerdo a la metodología descrita por Prescott (2002). El medio utilizado fue agar nutritivo adicionado con 0.4 % de gelatina y 2% de NaCl. Se esterilizó en autoclave por 20 min. a 115°C. Se dejó enfriar hasta 45°C y se vació el medio en cajas de Petri. Posteriormente se inocularon las cepas colocando un punto del cultivo en la caja de Petri y se incubó a 35°C de 2 a 5 días. El revelado de la prueba se realizó con una solución de cloruro de mercuríco (15 g), ácido clorhídrico concentrado (20 mL), y agua destilada (100 mL). Las placas se inundaron con 8 mL de la solución reveladora. Un precipitado blanco opaco indica presencia de gelatina no hidrolizada y la formación de una zona clara alrededor del crecimiento bacteriano indica hidrólisis de la gelatina.

#### **6.1.8.2 Hidrólisis de Tween 80 (producción de lipasas)**

Se usó un compuesto de Tween para evaluar la presencia de lipasas, ya que éstas son generalmente producidas en la presencia de lípidos tales como aceites, ácidos grasos, glicerol o Tweens (Gupta *et al.*, 2004). Se empleó el medio Agar-Tween (Prescott, 2002): peptona 10 g, cloruro de sodio 5 g, cloruro de calcio 0.1 g, agua destilada 1 L, Tween 80 (mono-oleato de polietelin sorbitan, éster del ácido oléico) 10 mL, agar 15 g, pH final 7.0-7.4. Las placas se inocularon sembrando con una estría y otras más con un punto de las cepas aisladas, y se incubaron a 35°C durante 1 a 5 días. Cuando el microorganismo es capaz de hidrolizar el Tween 80 aparece en el medio de cultivo un precipitado opaco alrededor del crecimiento bacteriano, debido a la combinación del Ca<sup>2+</sup> y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis. Cuando la bacteria no presenta la capacidad para hidrolizar el Tween no se observa el precipitado.

### **6.1.8.3 Hidrólisis de almidón (producción de amilasas)**

Esta parte se realizó siguiendo la metodología descrita por Cowan y Steel (1993). Se utilizó agar almidón (peptona 10 g, NaCl 2%, extracto de carne 5g, almidón soluble 2 g, agar-agar 20 g y agua destilada 1000 mL. pH 7.2). Se inocularon dos puntos en la superficie de la placa y posteriormente se incubaron durante dos días a 35°C. La lectura se realizó añadiendo 10 mL de lugol sobre las placas. Se consideró el resultado positivo cuando se observó la formación de un halo claro alrededor de las colonias.

### **6.1.8.4 Hidrólisis de celulosa (producción de celulasas)**

La hidrólisis de celulosa se evaluó a partir del análisis cualitativo de actividad celulolítica mediante la aplicación del tinte rojo Congo (Ariffin *et al.*, 2006). Las bacterias se inocularon en placas con medio TSA suplementado con 2% de NaCl y con carboximetilcelulosa (CMC) 1%. Se incubó a 35°C por 3-4 días. Transcurrido el tiempo de incubación se reveló la prueba inundando las placas con solución de rojo Congo 1% en agitación constante durante 10 min a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo se descartó el exceso de colorante y se lavó dos veces con NaCl 0.8M durante 5 min en agitación. La degradación se observó en halos de degradación alrededor del cultivo bacteriano (Wood *et al.*, 1988).

### **6.1.9 Curva de crecimiento**

Con base en la selección previa de los aislados bacterianos, se realizó una curva de crecimiento (absorbancia vs tiempo) de estos, para conocer sus fases de adaptación (exponencial y estacionaria), ya que en la fase exponencial es en la cual se manejan los aislados. Para esto se preparó medio TSC y MRS caldo con 2% de NaCl, el cual fue inoculado con 20 µL del stock de cada uno de los aislados y se incubaron a 35°C. Se determinó la absorbancia (540 nm) a las 6, 24, 48, 72 y 96 h en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 2 (Thermo Scientific, Rochester, E.U.A). El cambio entre la intensidad de luz que incide en el cultivo ( $I_0$ )

y la transmitida ( $I$ ) se registra en el espectrofotómetro como absorbancia ( $A$ ) o densidad óptica (D.O.), valor derivado del log del cociente entre  $I_0$  y  $I$  de la luz transmitida por la suspensión,  $A = \log I_0/I$  (Acebo-González y Hernández-García, 2013).

#### **6.1.10 Pruebas bioquímicas primarias**

Con la finalidad de determinar de manera presuntiva el género de las bacterias aisladas se procedió a realizar las siguientes pruebas bioquímicas.

##### **6.1.10.1 Tinción de Gram**

Se realizó la tinción de Gram (Gram, 1884) a los aislados que no presentaron actividad hemolítica positiva en la prueba de antagonismo contra vibrios. Para este análisis se usó un kit comercial (Cat. # 212539, BD & Company, Franklin Lakes, NJ E.U.A). Lo anterior sirvió para determinar si los aislados eran de tipo Gram (+) o Gram (-). Además, se determinó la forma celular característica de cada bacteria mediante su observación bajo el microscopio (cocos, bacilos, espirilos y espiroquetas) (MacFaddin, 2003).

##### **6.1.10.2 Oxidasa**

Esta prueba sirve para determinar la presencia de enzimas oxidasas, la cual tiene su origen en un sistema citocromo-oxidasa que activa la oxidación del citocromo para reducirlo por el oxígeno molecular y producir agua o peróxido de hidrógeno, según la especie bacteriana (Steel, 1961). Así mismo, la presencia de oxidasa va ligada a la producción de catalasa, ya que ésta degrada el peróxido de hidrógeno que se produce como consecuencia de la reducción del oxígeno y cuya acumulación es tóxica. Se impregnan discos de papel con parafenilendiamina y se coloca en un cultivo creciendo en placas de agar nutritivo. Si las células contienen citocromo c oxidasa, el reactivo se vuelve de color violeta o púrpura, si no es así, el disco se queda incoloro (MacFaddin, 2003).

### 6.1.10.3 Catalasa

La catalasa es una enzima presente en la mayoría de los microorganismos que poseen citocromos. Las bacterias que sintetizan catalasa hidrolizan el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno gaseoso que se libera en forma de burbujas. La catalasa es una enzima que protege a las células frente al peróxido de hidrógeno producido en el metabolismo del oxígeno (Shimizu *et al.*, 1984). Cataliza la formación de agua y oxígeno a partir del peróxido de hidrógeno. La actividad catalasa se detecta añadiendo unas gotas de peróxido de hidrógeno sobre las colonias en placa que no sea de agar sangre (daría falsos positivos). La producción de burbujas indica la presencia de la enzima (MacFaddin, 2003)

### 6.1.10.4 Formación de esporas

La endoespora bacteriana es una estructura altamente deshidratada y rígida, que es formada por algunos bacilos Gram positivos. Los géneros bacterianos de interés en medicina veterinaria que son capaces de formar endoesporas son *Bacillus* y *Clostridium* (Sonenshein, 2000). Estos responden de manera diferente a las condiciones ambientales que inducen la formación de la espora. Se preparan dos frotis fijos a partir del cultivo, uno de los cuales fue teñido con la tinción de Gram y el otro con la tinción de verde de malaquita. En la tinción de Gram las esporas se observan como cuerpos refringentes sin teñir, mientras que con la tinción de malaquita las esporas se observan de color verde (Bartholomew y Mittwer, 1950) Adicionalmente se utilizó otra metodología, para identificar a las cepas formadoras de esporas por medio de calentamiento, ya que las endoesporas resisten las altas temperaturas, la desecación y la radiación. Las endoesporas pueden sobrevivir al calentamiento y originar nuevas formas vegetativas en un medio de cultivo. Esta metodología esta basada en la técnica descrita por Travers *et al.* (1987), para ello, se inoculó un tubo de caldo con una suspensión presuntiva de bacterias formadoras de esporas, la cual se calentó a 100°C durante 10 min, posteriormente fue enfriadas

e incubada en un medio de cultivo TSA a 35°C. El crecimiento de células después de la incubación es considerado un resultado positivo.

### **6.1.11 Pruebas de hidrofobicidad**

#### **6.1.11.1 Rojo Congo**

Las cepas aisladas y seleccionadas previamente se cultivaron en medio TSA con 2.0% de NaCl, adicionado con 0.03% de rojo Congo. Cada aislado se sembró por el método de estría cruzada y se incubó a 35 °C por 24 h. Se consideró un resultado positivo cuando las colonias adquirieron coloración rojiza oscura, y negativos cuando tomaron coloraciones de blanco a translúcido (Sharma *et al.*, 2006).

#### **6.1.11.2 Método de Adhesión Bacteriana a Hidrocarburos (Microbial Adhesion To Hydrocarbons, MATH)**

Se siguió la metodología descrita por Rosenberg (1984) para evaluar la adhesión bacteriana. Las cepas fueron crecidas en MRS caldo y TSC a 35°C por 24-48 h según corresponda. Las células de cada cultivo fueron lavadas con PBS estéril por centrifugación, en tres ocasiones, y posteriormente el cultivo se llevó a una densidad óptica de 1 a 540 nm ( $10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>). Cuatro mililitros de la suspensión se transfirieron a tubos tipo falcón de 15 mL y se mezclaron con 1 mL de xileno. Los tubos fueron agitados en un vortex por 2 min a máxima velocidad. Después de la mezcla, se dejaron reposar por 10 min para asegurar la separación de la fase acuosa y la orgánica. Finalmente se extrajo cuidadosamente 1 mL de la fase acuosa y se determinó su densidad óptica a 540nm. El porcentaje de hidrofobicidad se midió con la siguiente formula:

$$(2) H (\%) = \frac{(DO_i - DO_f)}{DO_i} \times 100$$

Donde:

H = hidrofobicidad

DO<sub>i</sub> = densidad óptica de la suspensión antes de la mezcla

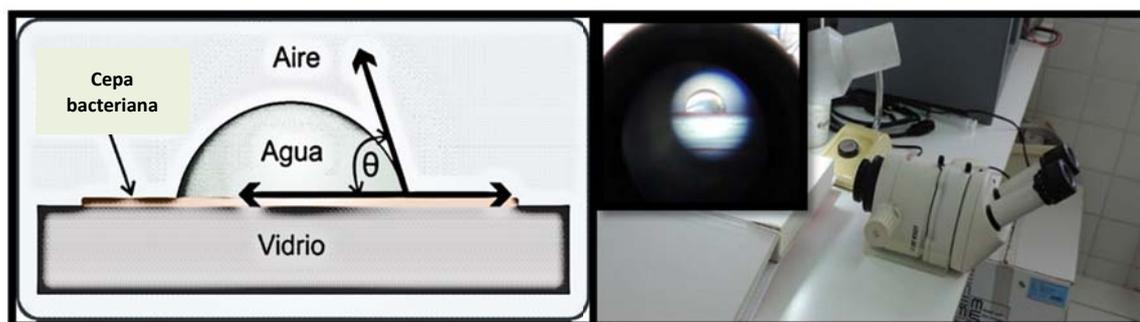
DO<sub>f</sub> = densidad óptica después de la mezcla

Cada prueba fue realizada por triplicado. Las cepas fueron consideradas como muy hidrofóbicas cuando los valores fueron mayores al 50%, ligeramente hidrofóbicas cuando los valores estuvieron entre un rango de 20-50%, e hidrofílicas cuando los valores fueron menores al 20% (Mattos-Guaraldi *et al.*, 1999).

### **6.1.11.3 Medida del Ángulo de Contacto (Contact Angle Meter testing, CAM)**

Con el objetivo de corroborar la hidrofobicidad de las cepas seleccionadas, se utilizó el método de la gota yacente para obtener la medida del ángulo de contacto entre una capa de bacterias y una gota de agua destilada. Este método ha sido empleado para evaluar la hidrofobicidad de microorganismos (Mozes y Rouxhet, 1987). Para obtener la CAM, se filtró una solución de células previamente enjuagadas con agua destilada estéril a través de un filtro de acetato de celulosa (2  $\mu$ m) mediante presión negativa, hasta la deposición de una capa de bacterias sobre el filtro. Posteriormente, se obtuvieron los resultados de ángulos de contacto mediante la técnica de la gota yacente con agua destilada estéril como solvente. La medida del ángulo de contacto se realizó con un sistema modificado basado en un goniómetro (instrumento que realiza mediciones estáticas y dinámicas de los ángulos de contacto que se forma entre la gota de agua depositada sobre una superficie y esta superficie (Burckhardt, 1985) tomando una foto de la gota con ayuda de un lente de microscopio y una cámara digital (Figura 9). Posteriormente las medidas de los ángulos de contacto se realizaron con ayuda del software ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, E.U.A.). Cada valor de ángulo de contacto ( $\theta$ ) obtenido proviene del promedio de 5 medidas, tanto

en el lado derecho, como en el lado izquierdo de la gota de agua sobre la capa de bacterias.



**Figura 9.**– Medición de ángulo de contacto entre una gota de agua destilada y una capa de bacterias (Mozes y Rouxhet, 1987), medido con un sistema modificado basado en un goniómetro.

#### 6.1.12 Identificación molecular de las cepas con potencial probiótico

Primeramente, el ADN total fue extraído de un cultivo inoculado de una colonia aislada de cada una de las cepas seleccionadas en el presente trabajo (RL5, C3, PB1-1, PB1-5 y PB1-6). Para ello, se utilizó el kit Fast DNA SPIN KIT (Biomedicals MP, Santa Ana, California, E.U.A.). El ADN fue purificado utilizando el kit Gene-Clean (Biomedicals MP), de acuerdo al procedimiento descrito por el fabricante y su cantidad fue determinada por medio de una lectura en un nanofotómetro (Implen, Munich, Alemania). Se emplearon los oligos 120F (actggcggacgggtgagtaa) y 518R (cgtattaccgcggtgctgg), los cuales amplifican la región V3/V4 del 16s rRNA. La amplificación se llevó a cabo en volúmenes de 25  $\mu$ L conteniendo 100 ng de ADN, 1.5 mM de  $MgCl_2$ , 0.5  $\mu$ M de cada oligo, 0.2 mM de cada dNTP y 1 U de Taq polimerasa en 20 mM de Tris/HCl (pH 9.0). Las reacciones se llevaron a cabo utilizando el siguiente programa: (1) Un ciclo de desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, treinta ciclos desnaturalizando a 95 °C por 1 min, alineando a 55 °C por 1 min y extensión a 72 °C por 1:30 min y (2) Un ciclo a 72 °C por 10 min como paso final. Los productos se purificaron utilizando el

kit QUIAquick PCR kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los productos obtenidos en el termociclador se verificaron en gel de agarosa al 2%. Los geles se tiñeron con una solución de bromuro de etidio y se documentaron en un foto-documentador (Molecular Imager R Gel Doc TM. XR +, Biorad). El ADN se cuantificó realizando mediciones directas en un nanofotómetro (Implen). Para la secuenciación se prepararon alícuotas del ADN a una concentración de  $1.3\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$  y se secuenciaron en la compañía GenWiz (NJ, E.U.A). Finalmente, las secuencias de nucleótidos se analizaron en la base de datos de la National Center for Biotechnology Information (NCBI) utilizando la plataforma BLASTn, aplicando la matriz BLOSUM 62, tomando como válidas las comparaciones cuyos porcentajes de cobertura e identidad fuesen superiores al 95%. Se utilizó como estadístico un e-valor inferior a 0.000001.

El árbol filogenético basado en las secuencias del gen 16S rRNA para las bacterias aisladas, fue construido empleando el software MEGA 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) y fue inferido usando el método de Neighbor-joining (Saitou y Nei, 1987). Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de Maximum Composite Likelihood (Tamura *et al.*, 2004). El análisis incluyó a 5 secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen espacios vacíos y datos perdidos fueron eliminadas. Hubo un total de 417 posiciones en el último conjunto de datos.

#### **6.1.13 Preservación de cepas con potencial probiótico**

Las cepas aisladas se conservaron en tubos criogénicos de 1 mL estériles con caldos MRS y TSC, según el caso, adicionados con un crioprotector de glicerol al 30%. Para ello, se mezclaron en cantidades iguales la suspensión de cultivo bacteriano (400  $\mu\text{L}$ ) y el crioprotector (400  $\mu\text{L}$ ) en un tubo de 1 mL. La concentración celular se fijó entre  $10^6$  a  $10^9$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Los tubos se colocaron en cajas criogénicas que se transportaron hasta el congelador a  $-80^\circ\text{C}$ , para su uso posterior.

## **6.2 PARTE II. Bioensayos *in vivo*: Evaluación de cepas seleccionadas con potencial probiótico en larvas y juveniles de moluscos bivalvos**

Se evaluaron las cepas aisladas y seleccionadas *in vitro*, en dos especies de moluscos bivalvos marinos de importancia comercial: el ostión Kumamoto (*C. sikamea*) y la almeja Catarina (*A. ventricosus*). Los bioensayos se evaluaron en diferentes etapas de la ontogenia de cada especie (larvas y juveniles). A continuación se detalla la metodología usada para cada especie por estadio.

### **6.2.1 Obtención de juveniles de *C. sikamea***

Los juveniles del ostión Kumamoto *C. sikamea* fueron donados por la empresa 'Acuacultura Robles, S.P.R de R.I.', localizada en La Bahía de La Paz, B.C.S., México (Figura 5) y llevados al Laboratorio de Cultivo de Moluscos del CIBNOR para ser acondicionados por una semana antes de ser utilizados en el bioensayo correspondiente. El acondicionamiento se realizó en taras rectangulares plásticas de 80 L con recirculación de agua, sistema tipo surgencia, adaptadas particularmente para muestras mas pequeñas de juveniles de bivalvos (Figura 10). La temperatura se mantuvo en  $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$  y la salinidad en 38 y se administró una ración diaria de *I. galbana* y *C. calcitrans* (1:1) a  $150 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>, con recambios diarios de agua.



**Figura 10.**– Unidades de Pre-engorda de semillas de moluscos con tamaño representativo, constituidas por una caja contenedora plástica y cilindros de surgencia con falso fondo de malla plástica construidos con tubería PVC de 4 y 6 " que operan manteniendo un flujo ascendente y recirculante por medio de aerosifones (Diseño: Mazón-Suástegui 2014, CIBNOR, S.C.).

### 6.2.2 Obtención de reproductores y larvas de *A. ventricosus*

Los reproductores de *A. ventricosus* se recolectaron maduros en Bahía Magdalena, B.C.S., México (24°35'N 112°00'O), y fueron donados por la empresa SISTEMAR (Figura 5). Se aplicaron las técnicas descritas por Mazón-Suástegui *et al.* (2005) para la obtención y cultivo de las larvas. Brevemente, los reproductores fueron inducidos al desove mediante choques térmicos entre los 17 y 29°C (en intervalos de 30 min en cada temperatura; máximo tres choques). Una vez inducido el desove, los reproductores fueron colocados de manera individual en contenedores plásticos de 4 L con agua de mar filtrada a las temperaturas indicadas para cada especie. Una vez separados los gametos por sexo, se tamizaron suavemente las suspensiones de óvulos utilizando un tamiz de 100 µm, para eliminar restos fecales y contaminantes de los adultos y luego fueron pasados por otro tamiz de 20 µm para recolectarlos. Para la fertilización se agregaron los gametos en un contenedor plástico de 10 L y se agregaron 2 mL de esperma de 3 o 4 machos por 1 mL de suspensión de óvulos. El contenido de huevos fertilizados del

contenedor se homogenizó y después se observaron al microscopio para confirmar el estado de los óvulos y calcular el número de ellos (fecundidad). Finalmente, los gametos fertilizados se sembraron en un tanque de fibra de vidrio de 1500 L a una densidad de 40 huevos mL<sup>-1</sup> con agua de mar filtrada (1 µm) y tratada con UV a una temperatura de 23 ± 1 °C y 37 ± 0.5 de salinidad por un tiempo de 24 h para asegurar la eclosión de larvas veliger o "D". Los tanques se manejaron por duplicado y fueron provistos de aireación ligera durante el desarrollo. Se hicieron observaciones para evaluar el estado de los embriones durante su desarrollo.

### 6.2.2.1 Seguimiento del desarrollo larvario

El cultivo larvario se realizó según los procedimientos descritos por Mazón-Suástegui (2005). Aproximadamente 24 h después de la fertilización, los tanques se drenaron y la población de larvas se colocó en contenedores de 10 L para realizar el estimado referente a la tasa de eclosión de larvas veliger. Se utilizaron larvas de 72 h para reducir el índice de mortalidad natural derivado del paso de la alimentación endógena (vitelo) a la exógena (microalgas).

Una vez que se obtuvieron las larvas veliger tempranas, se sembraron en tanques de 1500 L, por duplicado, a una densidad de 8 larvas mL<sup>-1</sup> (día 1 al 8) a una temperatura de 23 ± 1°C y 37 ± 0.5 de salinidad. En este periodo las larvas se alimentaron con la microalga *Isochrysis galbana* y a partir del día 9 en adelante se utilizó una mezcla de *I. galbana* y *Chaetoceros calcitrans* en proporción 1:1 suministradas a una densidad de 15 × 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup> (inicial) a 50 × 10<sup>3</sup> cel mL<sup>-1</sup> (final). Se realizaron recambios totales de agua a intervalos de 48 h durante el desarrollo larvario. Durante los días que no se efectuó el recambio de agua se restauraron las concentraciones de microalgas para compensar las consumidas el día anterior, además de tomar otros parámetros como fecha y hora de alimentación, temperatura y salinidad. Por otro lado, durante los días que se realizó el recambio de agua, se colocó en la salida de agua una batería de tamices de diferente apertura de malla dentro de un rango de entre 30 µm y 250 µm, y se tomaron muestras de

cada tamiz donde se retenían las larvas para hacer observaciones de su forma y actividad, además de su crecimiento diferencial por el rápido crecimiento de larvas sanas y el lento crecimiento de larvas enfermas.

### **6.2.3 Obtención de juveniles de *A. ventricosus***

Una vez que el 50% de la población larvaria presentó mancha ocular y pie (aproximadamente a los 14 días de cultivo), se comenzaron a fijar en colectores artificiales elaborados a base de costal de fibra plástica de colores oscuros para favorecer el asentamiento dado el carácter fototrófico negativo de las larvas. Los colectores fueron colocados en tanques de fibra de vidrio de 1500 L, previamente tratados al ser sumergidos en agua de mar filtrada y adicionada con microalgas, para ayudar a generar una biopelícula de bacterias que ayudara a incrementar el asentamiento (Uriarte *et al.*, 2001). Durante tres semanas las postlarvas recién fijadas se alimentaron de forma continua con la misma mezcla de microalgas provistas a las larvas, pero ahora de  $80$  a  $100 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>. Posteriormente, las postlarvas (semillas o juveniles tempranos) fueron separados con la ayuda de un chorro de agua y trasladados a unidades de preengorda tipo surgencia con recirculación ascendente de agua en cilindros de fibra de vidrio, donde se mantuvieron por cuatro semanas a  $23 \pm 1$  °C y una ración diaria de *I. galbana* y *C. calcitrans* (1:1) a  $150 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup> con recambios diarios de agua.

#### 6.2.4 Tratamiento de agua de mar para los bioensayos

El agua de mar utilizada para todos los bioensayos con larvas y juveniles de las especies seleccionadas pasó por un sistema de filtrado antes de ser utilizada en el Laboratorio de cultivo de moluscos del CIBNOR (Figura 11), de la siguiente manera, primero paso por un filtro de arena (A), posteriormente por un filtro de bolsa de 5  $\mu\text{m}$  (B) y de 1  $\mu\text{m}$  (C), para después seguir por un filtro de carbón activado (D) y finalmente por un filtro de esterilización por ultravioleta (E). Adicionalmente antes de entrar a los tanques de cultivo se paso el agua por un filtro de bolsa de 1  $\mu\text{m}$  (F).



**Figura 11.**– Sistema de filtrado del agua de mar del laboratorio de cultivo de moluscos del CIBNOR.

#### 6.2.5 Cultivo de microalgas

Las microalgas *Isochrysis galbana* (v. *aff galbana*, código UTEX LB 2307; CIBNOR) y *Chaetoceros calcitrans* (código DQ887756; IFREMER) fueron cultivadas con agua de mar filtrada (0.5  $\mu\text{m}$ ; 22 °C; salinidad de 36), esterilizada por UV y enriquecida con el medio f/2 y una solución de silicatos para la diatomea (Guillard 1975). Ambas especies fueron suministradas por el Laboratorio de microalgas del CIBNOR y se cosecharon durante su fase de crecimiento exponencial, cuando alcanzaron una concentración promedio de 4, 000  $\times 10^3$  en *I. galbana* y 3, 500  $\times 10^3$

en *C. calcitrans*. Dicha concentración se determinó diariamente mediante recuentos celulares utilizando un hematocitómetro o cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad (Helm *et al.*, 2006) y apartir de esas concentraciones se calcularon las concentraciones diarias utilizadas en cada bioensayo.

### 6.2.6 Reactivación de cepas con potencial probiótico

Después del período de almacenamiento de las cepas de bacterias probióticas seleccionadas (*L. graminis* cepa RL5), *B. cereus* (PB1-1), *B. flexus* (PB1-5), y *B. firmus* (PB1-6), todas aisladas de *N. subnodosus*, así como *L. plantarum* (cepa C3 aislada de *P. sterna*), todas se descongelaron a temperatura ambiente y se tomó una alícuota de 100  $\mu$ L de suspensión recuperada para ser inoculada directamente en placa conteniendo agar MRS para *Lactobacillus* spp. y TSA para *Bacillus* spp., para obtener una cuenta viable de células. Se tomó otra alícuota de 100  $\mu$ L del material recuperado y se empleó para la reactivación de la cepa en tubos tipo Falcon estériles de 15 mL con 10 mL de caldo de cultivo MRS (#288110, Bioxon BD, Franklin Lakes, NJ) para los *Lactobacillus* spp. y TSC (# 257107, Bioxon) para los *Bacillus* spp. Esto se hizo a una temperatura de incubación de 35°C por 24-48 h, respectivamente, pero para el caso de *Bacillus* spp. se incubaron en agitación constante (120 rpm). Posteriormente se recogieron las células por centrifugación (4696  $\times g$ , 10 min at 4 °C) y el precipitado se re-suspendió en una solución salina estéril (NaCl 2%) para lavar las células, por dos ocasiones, a las mismas condiciones de centrifugación. Posteriormente para el conteo celular, la solución bacteriana fue ajustada a una densidad óptica de 1.0 en un espectrofotómetro Thermo Spectronic Genesys 2 (Thermo Scientific, Rochester, E.U.A) a una longitud de onda de 540 nm para obtener una concentración aproximada de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup> de acuerdo al estándar de McFarland. A partir de esa concentración, se hicieron las diluciones pertinentes para ajustar la concentración bacteriana requerida en los diferentes tratamientos establecidos ( $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>), que se confirmaron mediante el conteo de UFC en placa, utilizando diluciones seriadas sobre placas de agar correspondiente a cada tratamiento utilizado. Para esto 100  $\mu$ L de cada

dilución se colocaron y extendieron sobre placas de Petri con TSA y MRS agar según corresponda. Se dejaron incubar a 35°C, para luego del período de crecimiento, examinar las placas y contar aquéllas que tienen entre 30 y 300 colonias por placa.

### **6.2.7 Bioensayo 1: Evaluación de cepas probióticas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y composición bioquímica de juveniles de *C. sikamea***

Este bioensayo se realizó en el Laboratorio de cultivo de moluscos del CIBNOR. Para esto se utilizaron unidades experimentales plásticas de 4 L (Figura 12) provistos con 2 L de agua de mar filtrada (ver sección 6.2.4) a una temperatura de  $23 \pm 1^\circ\text{C}$  y una salinidad de 38, en cada unidad se suministró una fuente de aireación moderada. Se utilizaron 3,600 juveniles de *C. sikamea*, obtenidos previamente según se detalla en la sección 6.2.1. En cada unidad experimental se colocaron 120 juveniles, de  $6.1 \pm 0.1$  mm de altura de la concha y  $37.3 \pm 0.07$  mg de peso total húmedo. Los tratamientos experimentales se dividieron en: ocho tratamientos probióticos, un grupo tratado con antibiótico y un grupo control (ver Tabla II) por triplicado. Las unidades experimentales fueron drenadas, lavadas y suministradas con nueva agua de mar cada 48 h. La alimentación se fijo en una ración diaria de *I. galbana* y *C. calcitrans* (1:1) a  $150 \times 10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$ . Durante los recambios se tomaron muestras para determinar la supervivencia, el crecimiento en talla y peso húmedo y seco (ver sección 6.3.2) y la composición bioquímica (ver sección 6.3.4). Todos los tratamientos probióticos, incluyendo el antibiótico, se administraron directamente al agua en las mismas concentraciones y condiciones establecidas en el bioensayo anterior. La duración de este bioensayo fue de 35 días.



**Figura 12.**– Unidades experimentales de 4 L utilizadas para el cultivo de larvas y juveniles en los bioensayos.

**Tabla II.**– Tratamientos experimentales de cepas de probióticos, antibiótico y grupo control utilizadas para los bioensayos de larvas y juveniles de *A. ventricosus* y juveniles de *C. sikamea*.

<b>Cepa</b>	<b>Tratamiento</b>
RL5	<i>Lactobacillus graminis</i>
C3	<i>L. plantarum</i>
PB1-1	<i>Bacillus cereus</i>
PB1-5	<i>B. flexus</i>
PB1-6	<i>B. firmus</i>
MIX-L	<i>L. graminis</i> + <i>L. plantarum</i>
MIX-B	<i>B. cereus</i> + <i>B. flexus</i> + <i>B. firmus</i>
MIX-LB	MIX-L + MIX-B
AMP	Ampicilina
CTRL	Grupo control (sin probióticos ni antibiótico)

### **6.2.8 Bioensayo 2: Evaluación de cepas probióticas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y fijación de larvas de *A. ventricosus***

Para esto se utilizaron las mismas unidades experimentales plásticas del bioensayo anterior (sección 6.2.7) con las mismas condiciones de temperatura, aireación y salinidad. Las larvas producidas en el laboratorio según el procedimiento descrito en la sección 6.2.2, fueron sembradas en cada una de las unidades a una densidad de 8 larvas mL<sup>-1</sup> (160,000 larvas; 72 h de edad; 81.4 ± 1 µm de altura), y divididas en ocho tratamientos, un grupo tratado con antibiótico y un grupo control (ver Tabla II) por triplicado. La concentración de los tratamientos probióticos fue ajustada a 1 × 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup> (ver sección 6.2.6), y el antibiótico a una concentración de 10 mg L<sup>-1</sup>. Todos los grupos recibieron una alimentación diaria con las microalgas, de acuerdo a lo establecido en la sección 6.2.2.1 y posteriormente cada 48 h el tratamiento con probióticos o antibiótico directamente en el agua de cultivo. Este bioensayo se desarrolló durante nueve días, en los cuales se realizaron recambios al 100% de agua de mar cada 48 h. Estos recambios se hicieron con ayuda de una batería de tamices de diferentes tamaños de apertura de malla (30, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 180, 220 µm). Durante los recambios se tomaron muestras de larvas para estimar el efecto de los tratamientos sobre la tasa de crecimiento y supervivencia (sección 6.3.1), y al final se evaluó la tasa de fijación de la semilla (sección 6.3.3).

### **6.2.9 Bioensayo 3. Evaluación de cepas probióticas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y composición bioquímica de juveniles de *A. ventricosus***

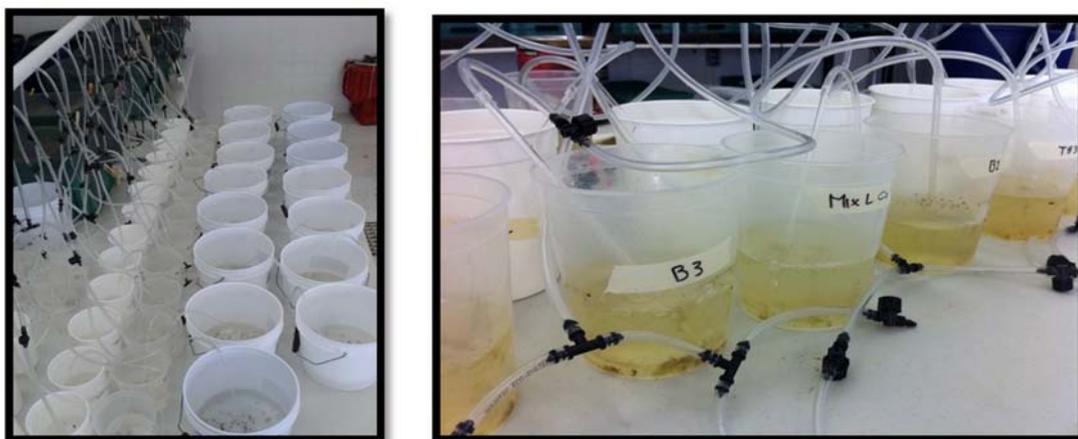
Para esto, se utilizó el mismo diseño experimental del bioensayo con larvas. Se utilizaron un total de 3,600 juveniles (48 días edad, 4.1 ± 0.06 mm altura de la concha; 13.3 ± 0.03 mg peso total húmedo) los cuales fueron divididos en los mismos tratamientos reportados anteriormente (Tabla II), en cada unidad se

colocaron 120 juveniles. Los tratamientos se manejaron por triplicado. Las condiciones de temperatura y salinidad, para este bioensayo fueron las mismas que para el bioensayo con larvas (ver sección 6.2.8). Se alimentaron diariamente con una ración de *I. galbana* y *C. calcitrans* (1:1) a  $150 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>. Este bioensayo se desarrolló durante 21 días, en los cuales se realizaron recambios al 100% de agua de mar cada 48 h. Durante los recambios se tomaron muestras para determinar la supervivencia, crecimiento en talla y peso húmedo y seco (ver sección 6.3.2) y la composición bioquímica (ver sección 6.3.4). Todos los tratamientos probióticos, incluyendo el antibiótico, se administraron directamente al agua en las mismas concentraciones y condiciones establecidas anteriormente.

#### **6.2.10 Bioensayo 4: Evaluación en juveniles de *A. ventricosus*, previamente tratados con los probióticos seleccionados, en un reto con *V. alginolyticus*.**

Este bioensayo se realizó 24 h después de la última dosis de tratamientos suministrada al finalizar el bioensayo anterior (ver sección 6.2.9). En este caso se seleccionaron 30 juveniles al azar de cada tratamiento evaluado (5-6 mm de altura; 20-25 mg de peso húmedo total) y se colocaron en unidades experimentales de 500 mL provistas con 300 mL de agua de mar filtrada (Figura 13). Los juveniles fueron infectados con una dosis única de *V. alginolyticus* (CAIM57) a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. Esta dosis se definió con base en la dosis letal media (DL<sub>50</sub>) determinada mediante el análisis probit (análisis de regresión logística) basado en el modelo dosis-respuesta descrito por Finney (1971), usando la hoja de cálculo EXCEL (Microsoft® Excel® Ver. 14.0 para Mac. Redmond, E.U.A.). Adicionalmente se utilizaron dos controles más, un control negativo (CTRL-) que consistió en grupo de juveniles sin tratamiento y sin administración del *Vibrio* y un control positivo (CTRL+) que consistió en un grupo de juveniles sin tratamiento pero con la administración del patógeno. El reto tuvo una duración de 120 h, y se realizó en el Laboratorio de Bioseguridad del CIBNOR. La temperatura se fijó en  $23 \pm 1^\circ\text{C}$ . Los

juveniles se alimentaron diariamente con la microalga *I. galbana* ( $80 \times 10^3$  células  $\text{mL}^{-1}$ ). Se realizaron muestreos antes de la infección (T0), y durante la infección a las 24, 48, 72, 96 y 120 h para determinar la supervivencia (%), haciendo un conteo de organismos muertos. Así mismo, se tomaron muestras para determinar el conteo total de *Vibrio* al inicio y al final del bioensayo de cada tratamiento (ver sección 6.3.6). También se tomaron muestras a las 48, 72, 96 y 120 h, para determinar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (ver sección 6.3.5). Las unidades experimentales no tuvieron recambios de agua durante el reto.



**Figura 13.**– Unidades experimentales (UE-1L) utilizadas en el reto de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* con *V. alginolyticus*.

### 6.3 Parámetros evaluados

#### 6.3.1 Crecimiento absoluto ( $\mu\text{m}$ ), tasa de crecimiento ( $\mu\text{m d}^{-1}$ ) y supervivencia (%) de larvas

En cada recambio de agua después de tamizar las larvas, éstas se suspendieron en un contenedor de 500 mL, se homogenizaron consistentemente (con ayuda de un homogeneizador tipo raseras circulares) y se tomaron muestras de 1 mL por triplicado, las cuales se colocaron en una cámara de conteo Sedgewick

Rafter, para estimar el total de larvas vivas y con ello determinar la supervivencia (%). Todo el material utilizado se enjuagó perfectamente con agua corriente previo a su uso. De cada tratamiento se tomaron imágenes digitales, con ayuda de una cámara digital y un microscopio compuesto marca Olympus BX-41 (Olympus Corporation Inc., Tokio, Japón) para estimar el crecimiento absoluto de las larvas, con base en la altura promedio de la concha (0.1  $\mu\text{m}$ ). A partir de estos datos se determinó la tasa de crecimiento ( $\mu\text{m d}^{-1}$ ).

La tasa de crecimiento se determinó con la fórmula:

$$(3) \text{ Tasa crecimiento (tc)} = \frac{(T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}})}{(t)}$$

Donde:

$T$  = talla inicial y final del periodo experimental

$t$  = tiempo en días

Las imágenes se tomaron de tres diferentes campos de la muestra, y de cada campo se seleccionaron imágenes de 10 larvas al azar. Estas imágenes se analizaron con la ayuda del programa Image Pro Plus® (vers. 5.1, Media Cybernetics, Bethesda, E.U.A.) que permite determinar automáticamente las toma de mediciones seleccionadas, previa calibración. Este procedimiento se realizó en cada recambio de agua durante todo el tiempo que duraron los bioensayos.

### **6.3.2 Crecimiento absoluto (mm, mg), tasa de crecimiento (mm d<sup>-1</sup>, mg d<sup>-1</sup>) peso seco y supervivencia (%) de juveniles**

En cada recambio de agua se contabilizaron el número de juveniles de cada especie para determinar la supervivencia (%). Así mismo, se tomaron 30 muestras de juveniles de cada réplica, por tratamiento, y se colocaron en una hoja de papel milimétrico. De cada tratamiento se tomaron imágenes digitales, con ayuda de una cámara digital, para estimar el crecimiento de los juveniles a con base en los datos

de la altura promedio de la concha (0.1 mm). A partir de estos datos se determinó la tasa de crecimiento ( $\text{mm d}^{-1}$ ).

La tasa de crecimiento (talla) se determinó con la fórmula:

$$(4) \text{ Tasa crecimiento (tc)} = \frac{(T_{\text{final}} - T_{\text{inicial}})}{(t)}$$

Donde:

$T$  = talla inicial y final del periodo experimental

$t$  = tiempo en días

Las imágenes se tomaron de tres diferentes campos de la muestra, y de cada campo se seleccionaron imágenes de 10 juveniles al azar. Estas imágenes se analizaron con la ayuda del programa Image Pro Plus (vers. 6.0, Media Cybernetics, Bethesda, MD), que determinó automáticamente la toma de mediciones seleccionadas, previa calibración. De manera similar, para determinar el peso húmedo total (0.1 g), los juveniles se pesaron en una balanza analítica de precisión, con 30 muestras por tratamiento tomadas aleatoriamente. Con estos datos se determinó el peso húmedo absoluto (0.1 g) y la tasa de crecimiento en peso húmedo ( $\text{g d}^{-1}$ ).

La tasa de crecimiento (peso) se determinó con la fórmula:

$$(5) \text{ Tasa crecimiento (tc)} = \frac{(P_{\text{final}} - P_{\text{inicial}})}{(t)}$$

Donde:

$P$  = peso inicial y final del periodo experimental

$t$  = tiempo en días

Para determinar el peso seco se tomaron 30 muestras al inicio y al final de

cada tratamiento, y se secaron en una estufa a 80°C por 48 h. Este procedimiento se realizó en cada recambio de agua durante todo el tiempo que duro el bioensayo.

### **6.3.3 Tasa de fijación de juveniles**

Al finalizar el desarrollo larvario, cuando aproximadamente la mitad de la población alcanzó el estadio pediveliger, se evaluó la etapa de fijación de los juveniles. Durante esta etapa, la temperatura y salinidad, así como las características del mantenimiento, se mantuvieron dentro de los mismos valores previamente reportados por especie. En todos los casos se alimentó diariamente con la mezcla de microalgas reportada en este trabajo a concentraciones de 80 a  $100 \times 10^3$  células mL<sup>-1</sup>. El manejo de los cultivos en esta etapa consistió en recambios totales de agua de mar filtrada, cada 48 h los primeros 5 días y posteriormente se realizaron diariamente, colocando una batería de tamices desde los 180 a 280 µm de apertura de malla. Durante los recambios se estimó la densidad larvaria y el conteo de microalgas residuales para complementar las raciones de alimento necesarias diariamente. Estos se mantuvieron durante tres semanas para después ser contabilizados despegando los juveniles de las paredes de las unidades experimentales, mediante chorros de agua ligeros. Del total de juveniles recuperados se colocaron muestras de 10 mL, por triplicado, en una probeta graduada, y de cada muestra se contabilizó su número para estimar, por extrapolación, la fijación total de juveniles. Este dato se expresó después en porcentaje (%).

### **6.3.4 Análisis bioquímicos de juveniles**

Se tomaron muestras de juveniles de cada especie de los diferentes tratamientos al inicio y al final de los bioensayos, los cuales fueron almacenados a -80°C para su análisis correspondiente.

#### 6.3.4.1 Descalcificación

Primeramente, las muestras húmedas de juveniles se colocaron en tubos eppendorf de 2 mL y se les agregó solución descalcificante (900 mL de agua, 100 mL de HCl, 0.7 g de EDTA y 0.14 g de tartrato de sodio potasio) cada hora hasta que los tejidos se precipitaban al fondo de los tubos, en cada hora se retiraba el sobrenadante y se reponía la solución descalcificante.

Para las muestras de tejidos en fresco, se pesó una porción de aproximadamente 0.1 g en un tubo eppendorf de 2 mL, registrando el peso del tubo, el peso fresco del tejido y los datos de la muestra (Balanza Ohaus, AP250-D, NJ-E.U.A). Después, las muestras se liofilizaron para obtener el peso seco y posteriormente se rehidrataron en 3 mL de solución isotónica (solución salina de NaCl 35 %), agua destilada y agua desionizada. Posteriormente, las muestras se homogenizaron con ayuda de un homogeneizador de tejidos para obtener el extracto de trabajo. Estos se mantuvieron en frío, por triplicado, para conservar su integridad y se tomaron los volúmenes necesarios para realizar las siguientes pruebas:

#### 6.3.4.2 Carbohidratos totales

Para determinar la concentración de carbohidratos totales se utilizó un método basado en Roe *et al.* (1957). Muestras de 0.1 mL del extracto se colocaron en un tubo de vidrio, se agregó 1 mL de solución de antrona 0.1% diluida en ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) al 72%. Se calentaron a baño maría a 90 °C durante 5 min y se enfriaron en baño de hielo. Se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 620 nm.

Curva tipo: La solución estándar de carbohidratos contiene 5 mg mL<sup>-1</sup>, se prepararon diluciones en proporción 1:2, en 500 µL de ácido tricloracético (ATC) quedando concentraciones de 5, 2.5 1.25, 0.625, 0.3125, 0.15625, 0.078125 mg mL<sup>-1</sup> de carbohidratos.

La cantidad de carbohidratos se calculó con la siguiente relación:

$$(6) \text{ Concentración de carbohidratos (mg gr}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Abs.sol.prob.} \times \text{FD})}{(m \times \text{peso de la muestra})}$$

Donde:  $m$  es la pendiente en la curva tipo y FD es el factor de dilución

#### 6.3.4.3 Proteínas totales

Se determinaron utilizando la técnica del Ácido Bicinconínico o BCA (Fujimoto *et al.*, 1985), se basa en el principio de que las proteínas reducen los iones cúpricos a iones cuprosos bajo condiciones alcalinas. Los iones cuprosos reaccionan con el ácido bicinconínico, sal sódica (verdoso) para formar un color morado. El color formado es proporcional al contenido proteico de la muestra. Se utilizó una solución reactiva comercial de Sigma (solución de ácido bicinconinico B9643 y solución de sulfato de cobre II C2284).

Para esto se tomo una alícuota de 10 $\mu$ L del extracto de trabajo, la cual se puso a digerir en 100 $\mu$ L de hidróxido de sodio (NaOH) 0.1N durante 120 minutos, posteriormente se toman 25 $\mu$ L del digerido y se colocó en el fondo de una microplaca y a la cual se le agregó el reactivo comercial de BCA. Se incubó a 60°C durante 15 minutos y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 562 nm.

Se utilizó una solución estándar con una concentración de 2mg mL<sup>-1</sup> de albúmina bovina, la cual se diluya en proporción 1:2 en solución salina hasta tener concentraciones, de 2, 1 0.5, 0.25, 0.125, .0625 y 0.03125 mg mL<sup>-1</sup> de proteína y solución salina como blanco.

La concentración de proteínas se calculó según la fórmula:

$$(7) \text{ Concentración de proteínas (mg gr}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Abs.sol.prob.} \times \text{FD})}{(m \times \text{peso de la muestra})}$$

Donde: FD es el factor de dilución y  $m$  es la pendiente en la curva tipo.

#### 6.3.4.4 Lípidos totales

Para la determinación de lípidos totales se empleó el método de sulfofosfovainillina (Barnes y Blackstock, 1973), utilizando una solución reactiva para lípidos (fosfovainillina al 0.2% en ácido sulfúrico al 80%). Para esto, una alícuota de 0.025 mL (25 $\mu$ L) de cada muestra se colocó en tubos de vidrio con 0.25 mL de ácido sulfúrico concentrado, el cual se incubó a baño maría a 90 °C, por 10 min. Los tubos se enfriaron en baño de hielo para posteriormente tomar 20  $\mu$ L de cada tubo y colocarlos en una microplaca (placa Elisa) de 96 pozos. Esta se dejó incubar por 40 min a temperatura ambiente y se tomó la lectura de la placa en un espectrofotómetro de placas (Termo, Multiskan spectrum, Vantaa-Finlandia) a 540 nm. Se preparó una curva de calibración, con solución salina como blanco.

La cantidad de lípidos se calculó con la siguiente relación:

$$(8) \text{ Concentración de lípidos (mg gr}^{-1}\text{)} = \frac{(\text{Abs.sol.prob.} \times \text{FD})}{(m \times \text{peso de la muestra})}$$

Donde:  $m$  es la pendiente en la curva tipo y FD es el factor de dilución.

#### 6.3.5 Actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD)

Para determinar la actividad de la SOD, se tomaron aproximadamente 30 semillas por tratamiento las cuales fueron mantenidas en congelación a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar el análisis. Se maceraron y homogenizaron 100 mg de tejido en 0.5 mL de buffer fosfatos (50mM, pH 7.8), enseguida se centrifugo a  $9327 \times g$  por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ , y se recuperó el sobrenadante con el que se realizaron los análisis correspondientes. La actividad de la enzima SOD fue determinada usando un kit comercial (SOD Assay Kit-WST #19160, Sigma-Aldrich, E.U.A.). Los

resultados fueron expresados como una medida indirecta de la actividad de SOD, a través del porcentaje de inhibición de formación del complejo WST-1 (water-soluble tetrazolium) Formazán. Este kit utiliza un método colorimétrico indirecto, no mide directamente la actividad de la SOD, sino la presencia de radicales superóxido. El WST (water-soluble tetrazolium salt), en presencia de aniones superóxidos, forma un complejo coloreado que se mide a 440 nm. Por tanto a mayor actividad de SOD, menor cantidad de radicales superóxido en los tejidos y por tanto menor formación del complejo coloreado WST-formazan y viceversa.

### 6.3.6 Conteo de *V. alginolyticus*

Con juveniles de *A. ventricosus*, al final del reto se tomaron muestras de agua de cada tratamiento evaluado para realizar el conteo de UFC mL<sup>-1</sup> de *V. alginolyticus*. Para esto, se tomó 1 mL de la muestra de agua y se realizaron diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) en tubos tipo Falcon de 10 mL estériles con agua de mar estéril. Posteriormente, se diseminaron alícuotas de 0.1 mL de las diluciones y la muestra inicial, por duplicado, y se realizó la siembra por el método de dispersión sobre la superficie de placas Petri, previamente rotuladas y preparadas con agar Tiosulfato Citrato Bilis Sacarosa (TCBS, #265020 Difco, BD & Co., Franklin Lakes, NJ, E.U.A.). Las placas se incubaron a 35°C durante 24-48 h.

El conteo se realizó aplicando la siguiente fórmula:

$$(9) \text{ UFC mL}^{-1} = \frac{(\text{No.de colonias contadas} \times \text{FD})}{\text{Volumen de siembra}}$$

Donde:

UFC mL<sup>-1</sup>= Unidades Formadoras de Colonias por miligramo  
FD = Factor de dilución

### **6.3.7 Tratamiento estadístico de los datos**

Se realizaron pruebas de homogeneidad de varianzas de Levene y de bondad de ajuste de Kolmogorov-Smirnoff a cada réplica por tratamiento experimental para inferir la normalidad de datos. Se utilizaron ANOVAs de una vía, junto con pruebas de rangos múltiples de medias de Tukey, para detectar diferencias significativas en los valores de crecimiento, supervivencia y tasa de fijación, variables bioquímicas (contenido de lípidos, proteínas y carbohidratos) y actividad enzimática (SOD) en función de los tratamientos de probióticos suministrados. Para todos los análisis efectuados, el nivel de significancia se fijó a una  $P \leq 0.05$ . Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los programas estadísticos Statistica (Ver. 7.0, SoftStat Inc., Tulsa, OK, E.U.A.) y SPSS (Ver. 15.0, SPSS Inc. by IBM Company, Chicago, IL, E.U.A.). Para los gráficos se utilizó el programa SigmaPlot (Ver. 12.3, Systat Software Inc. (SSI), San Jose, CA, E.U.A.).

## 7. RESULTADOS

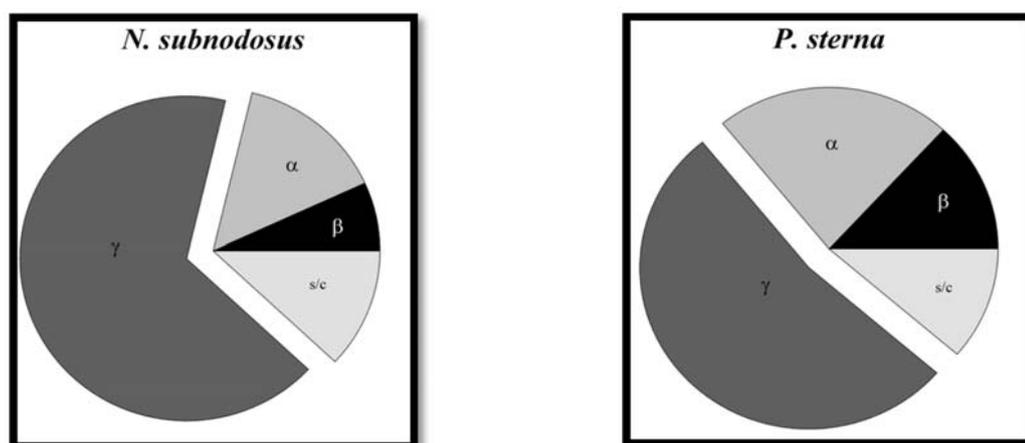
### 7.1 PARTE I. Bioensayos *in vitro*

#### 7.1.1 Aislamiento y purificación de cepas de bacterias

Se aislaron y purificaron un total de 109 tipos bacterianos, de los cuales 56 fueron del TGI de *N. subnodosus* y 53 aislados del tracto digestivo de *P. sterna*.

#### 7.1.2 Actividad hemolítica

A las 109 bacterias aisladas y purificadas se les determinó la actividad hemolítica. De las 56 bacterias aisladas del tracto digestivo de *N. subnodosus*, se encontraron 4 con hemólisis beta ( $\beta$ ), 8 con hemólisis alfa ( $\alpha$ ), 37 con hemólisis gamma ( $\gamma$ ) y 7 que no presentaron crecimiento (s/c). Las bacterias con hemólisis beta y alfa fueron desechadas. Así mismo, de las 53 bacterias aisladas del tracto digestivo de *P. sterna* se encontraron 7 con hemólisis beta ( $\beta$ ), 12 con hemólisis alfa ( $\alpha$ ), 28 con hemólisis gamma ( $\gamma$ ) y 6 no presentaron crecimiento (s/c). De igual manera, las bacterias con hemólisis beta y alfa no se tomaron en cuenta para el proceso de selección (Figura 14).



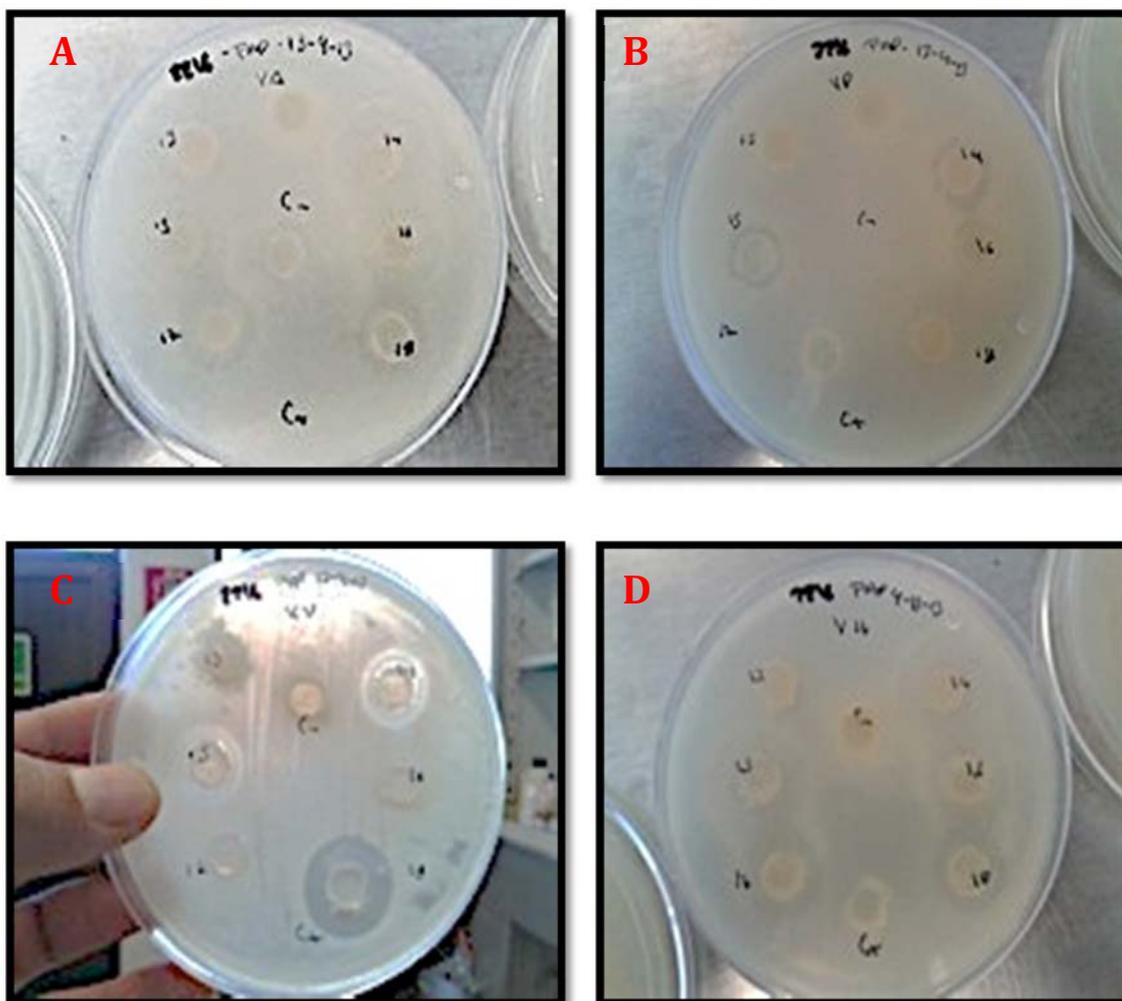
**Figura 14.**– Proporción de bacterias aisladas de acuerdo al tipo de hemólisis según el patrón descrito por Koneman *et al.* (2001).

### 7.1.3 Actividad antagónica

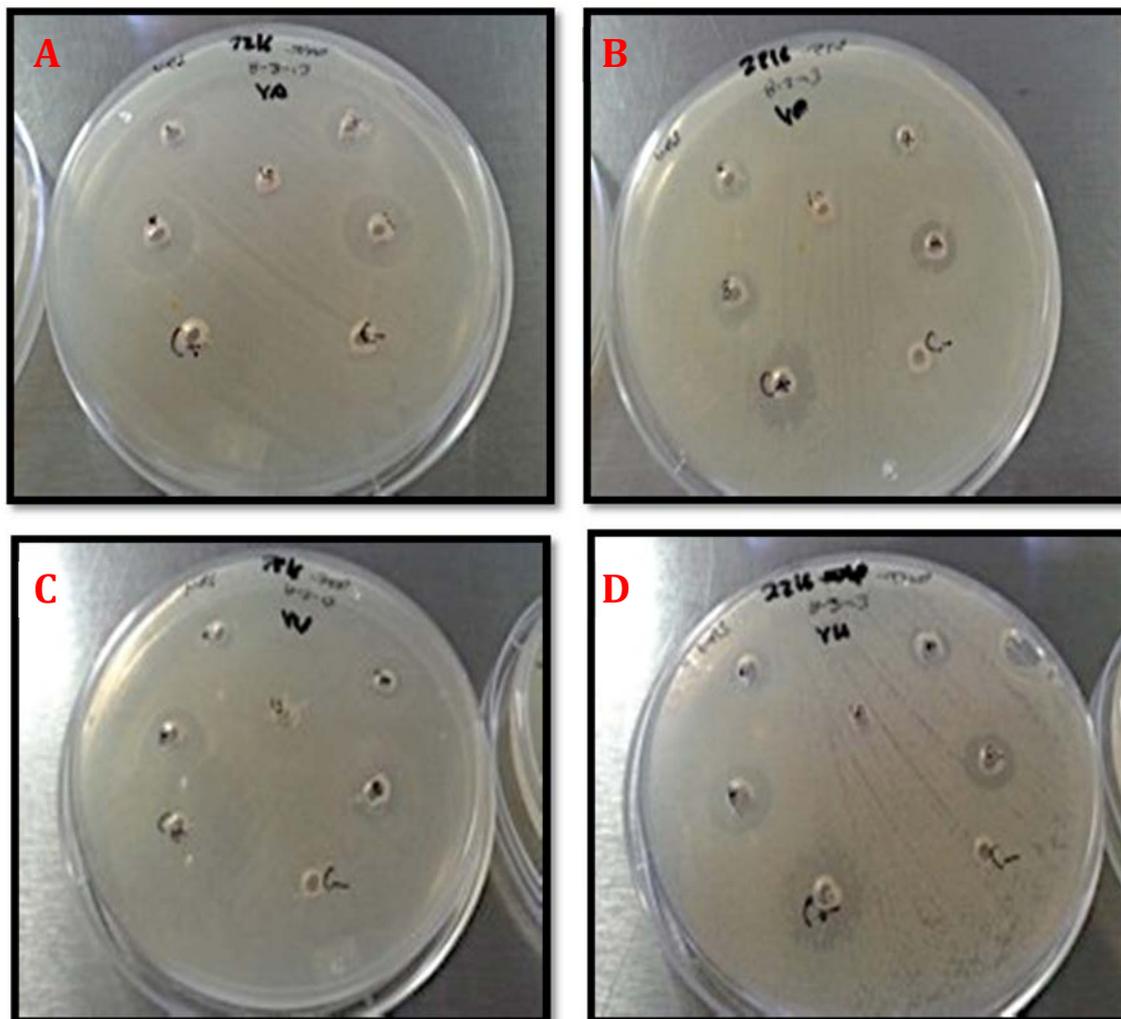
De las cepas aisladas y seleccionadas anteriormente se tomaron en cuenta para este proceso solo las cepas que presentaron hemólisis gamma ( $\gamma$ ). Se seleccionaron dos cepas, las cuales presentaron los mayores halos de inhibición contra las cuatro especies de *Vibrio* seleccionadas para este estudio. Los aislados RL5 y C3 presentaron fuerte inhibición a los vibrios, mientras que el resto de las cepas no presentaron halos de inhibición, o fueron menores a 5 mm al utilizar las metodologías de discos de agar (Met. 1) y pozos en agar (Met. 2) (Tabla III). Los dos aislados inhibieron a *V. alginolyticus* en presencia y ausencia de células, el aislado C3 con halos de inhibición de entre 14 y 20 mm y el aislado RL5 con halos de entre 10 y 15 mm. Para el caso de *V. parahaemolyticus* las dos cepas presentaron efecto inhibitorio en ausencia de células con halos no mayores a 8 mm, como en presencia de células con halos pequeños no mayores a 7 mm. Para *V. harveyi*, los aislados RL5 y C3 presentaron inhibición con ambas metodologías, con halos de entre 15 y 19 mm de diámetro en presencia de células y de entre 12 y 19 mm en ausencia de células. Finalmente, para *V. vulnificus* las dos cepas presentaron inhibición en ausencia de células con halos de entre 6 y 13 mm de diámetro, mientras que en presencia de células solo el aislado C3 presentó inhibición con un halo de 14mm (Figuras 15 y 16). Para el caso de inhibición contra *V. alginolyticus* y *V. harveyi*, los diámetros de los halos fueron significativamente diferentes ( $F= 34.9$ ) entre las dos metodologías utilizadas, mientras que para *V. parahaemolyticus* y *V. vulnificus*, dichas diferencias no fueron significativas (Figuras 17 y 18). El porcentaje de inhibición relativo de C3 fue de 83%, 33%, 84% y 64%, respectivamente, para *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. harveyi* y *V. vulnificus* con la metodología 1, y de 62%, 37%, 53% y 58%, respectivamente, con la metodología 2. Para el caso de RL5, el porcentaje de inhibición para las mismas cepas fue de 67%, 20%, 68% y 0% con la metodología 1 y de 41%, 37%, 38% y 39% con la metodología 2 (Figura 19).

**Tabla III.**– Actividad antagónica de las bacterias seleccionadas en contra de cuatro vibrios patógenos marinos, determinada por la medición de halos de inhibición usando dos metodologías; (1) discos de agar (Metodología 1) y (2) pozos en agar (Metodología 2).

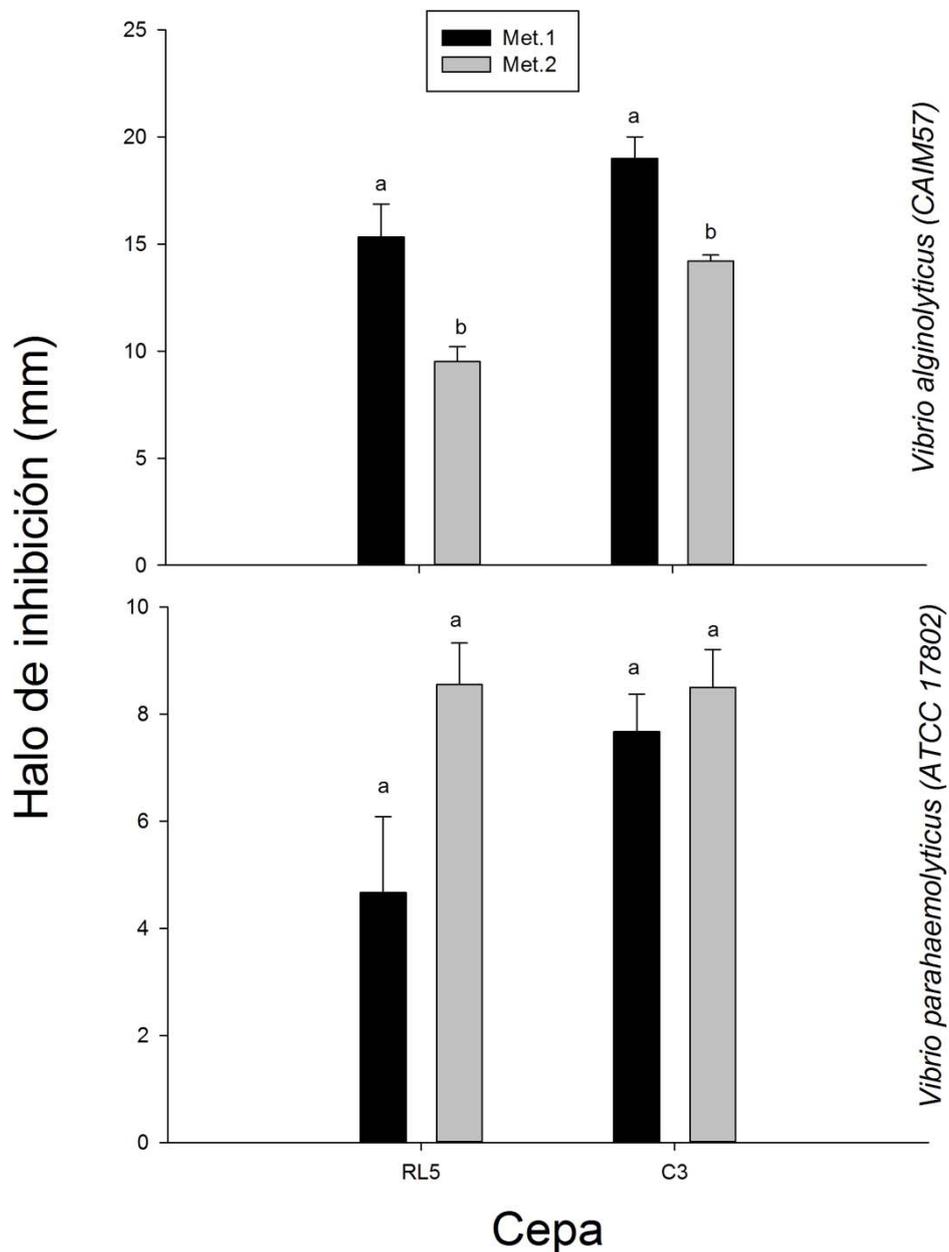
Cepa	Halo de inhibición (mm ± DE)							
	<i>V. alginolyticus</i>		<i>V. parahaemolyticus</i>		<i>V. harveyi</i>		<i>V. vulnificus</i>	
	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)	(1)	(2)
RL5	15.3 ± 1.5	9.5 ± 0.7	4.6 ± 1.4	8.5 ± 0.7	15.6 ± 2.0	8.7 ± 0.3	–	8.9 ± 1.2
C3	19.0 ± 1.0	14.2 ± 0.2	7.6 ± 0.7	8.5 ± 0.7	19.3 ± 1.5	12.3 ± 0.2	14.6 ± 0.5	13.2 ± 0.3



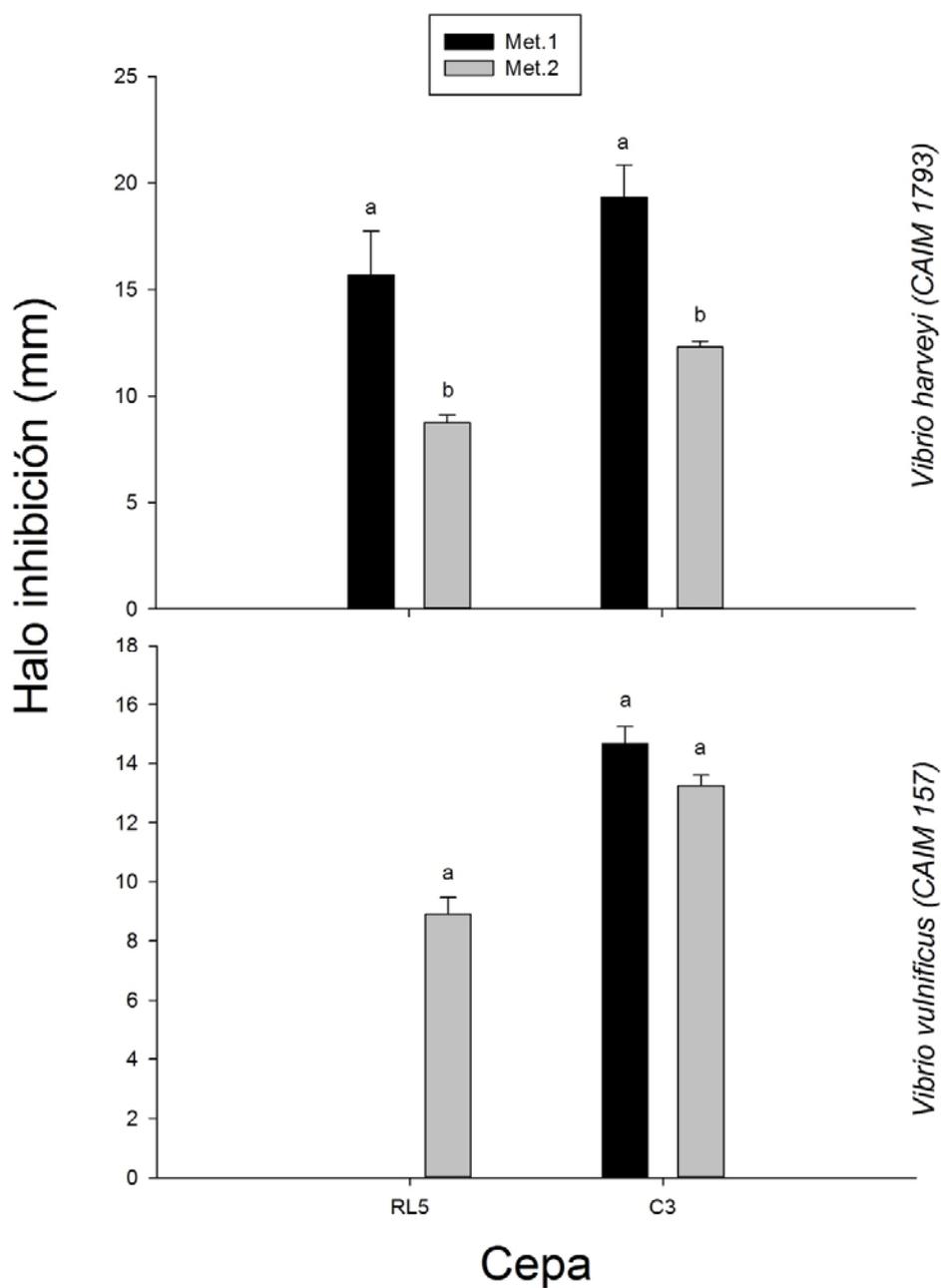
**Figura 15.**– Halos de inhibición de las cepas RL5 y C3 retadas in vitro contra las cepas patógenas: (A) *V. alginolyticus* (CAIM57); (B) *V. parahaemolyticus* (ATCC17802); (C) *V. vulnificus* (CAIM157) y (D) *V. harveyi* (CAIM1793) aplicando la metodología de discos de agar (Metodología 1).



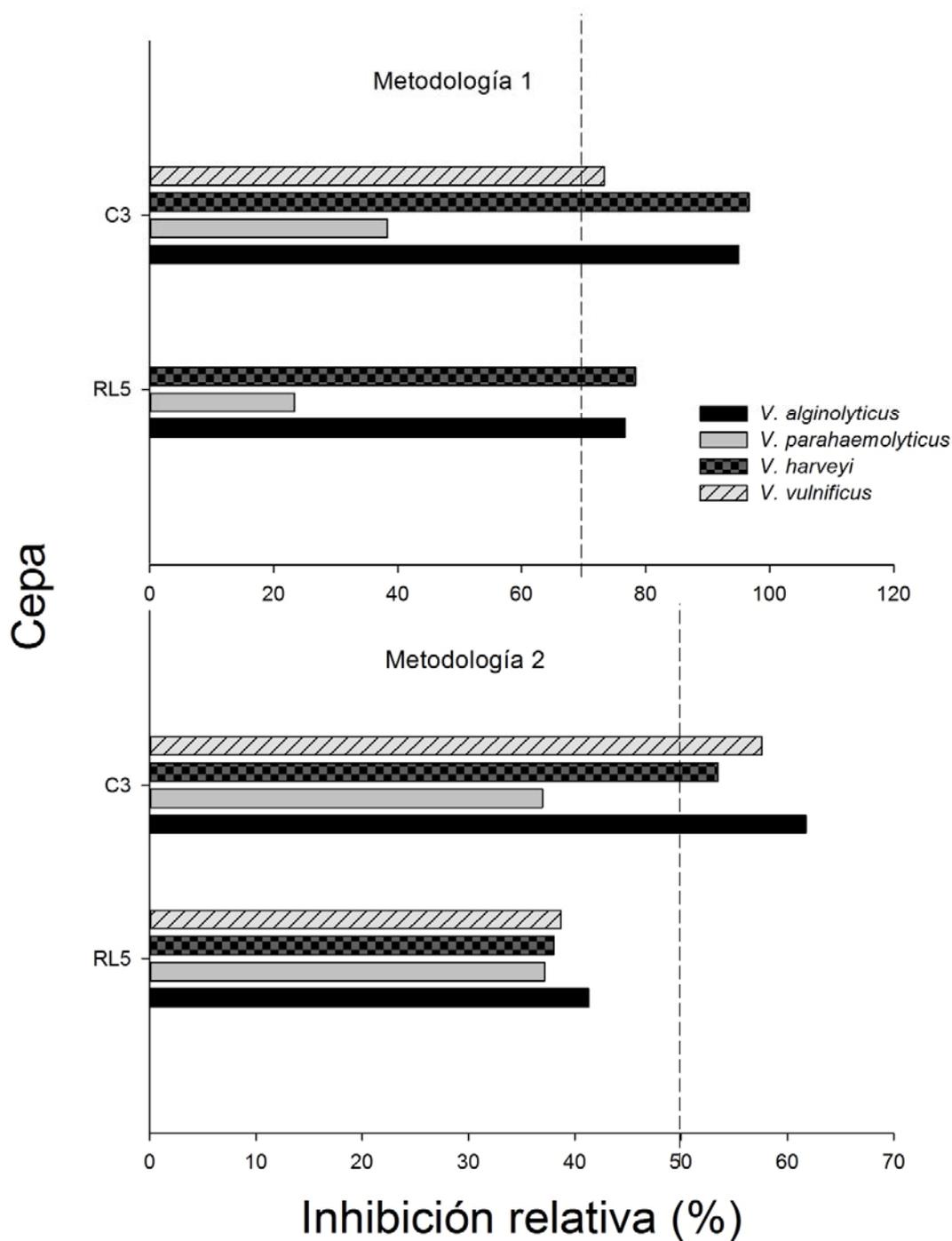
**Figura 16.**– Halos de inhibición de las cepas RL5 y C3 retadas in vitro contra las cepas patógenas: (A) *V. alginolyticus* (CAIM57); (B) *V. parahaemolyticus* (ATCC17802); (C) *V. vulnificus* (CAIM157) y (D) *V. harveyi* (CAIM1793) aplicando la metodología de pozos en agar (Metodología 2).



**Figura 17.**– Inhibición en presencia (Met. 1= Metodología 1) y ausencia de células (Met. 2= Metodología 2) de *V. alginolyticus* y *V. parahaemolyticus* por bacterias aisladas de mano de león. Los datos expresan la media (mm)  $\pm$  DE (diámetro de inhibición). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 18.**– Inhibición en presencia (Met. 1= Metodología 1) y ausencia de células (Met. 2= Metodología 2) de *V. harveyi* y *V. vulnificus* por bacterias aisladas de mano de león. Los datos expresan la media (mm)  $\pm$  DE (diámetro de inhibición). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 19.**– Porcentaje de inhibición relativa de las cepas RL5 y C3 contra los vibrios patógenos seleccionados. Alta inhibición cuando porcentaje de inhibición relativo es >70%, intermedia entre el 50-70% y baja cuando es <50%.

#### 7.1.4 Actividad enzimática extracelular

Adicionalmente, se seleccionaron tres cepas que presentaron actividad extracelular de diversas enzimas. Las pruebas de actividad enzimática extracelular mostraron que los aislados PB1-1, PB1-5 y PB1-6 presentaron producción de diversas enzimas, siendo las amilasas las que presentaron mayores halos de hidrólisis (> 15 mm). Así mismo, la producción de proteasas se manifestó en todos los aislados, con halos mayores a los 6 mm, en tanto que la producción de lipasa y celulasa solo se manifestó en dos aislados: la cepa PB1-1 y PB1-5, con halos < 5 mm (Tabla IV).

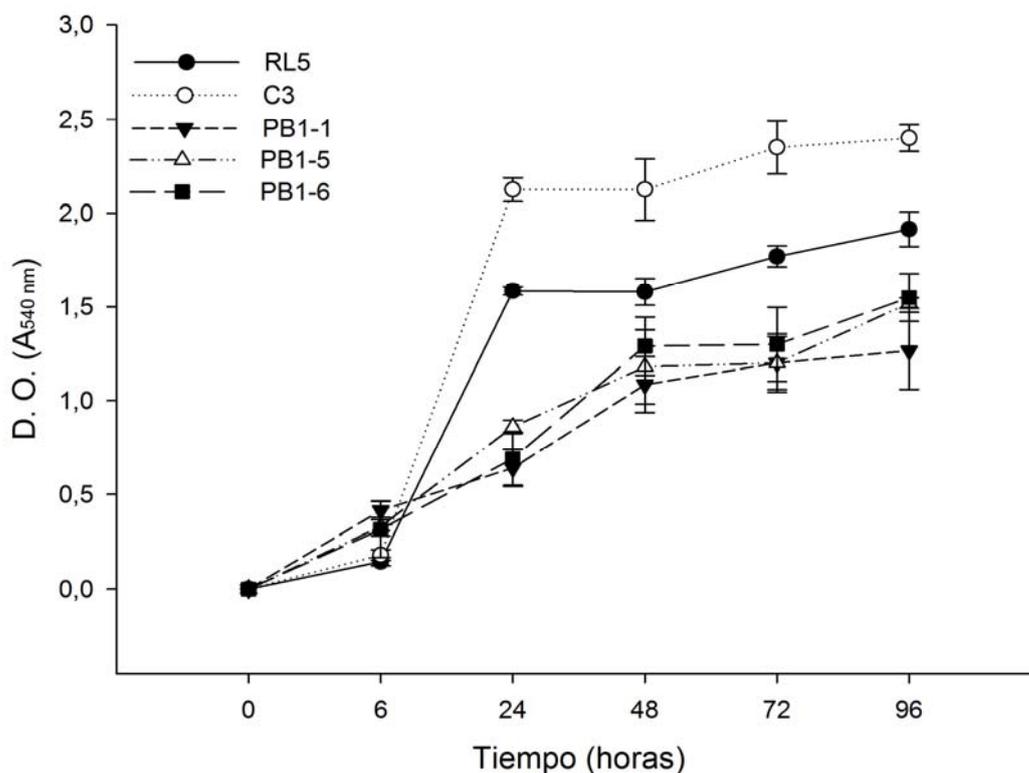
**Tabla IV.**– Producción de enzimas extracelulares (proteasa, lipasa, amilasa y celulasa) de las bacterias aisladas.

Cepa	Hidrólisis				
	Caseína	Gelatina	Tween 80	Almidón	Celulosa
RL5	–	–	–	–	–
C3	–	–	–	–	–
PB1-1	++	++	+	++	+
PB1-5	–	+	+	++	+
PB1-6	++	++	–	+++	–

Tamaño de halo de hidrólisis (mm): –, 0; +, ≤ 5; ++, > 6; +++, >15.

### 7.1.5 Curva de crecimiento

En la Figura 20 se observa el crecimiento de las cepas seleccionadas durante 96 h de incubación; para RL5 y C3 se presenta la fase exponencial a las 24 h de incubación en caldo MRS. Por su parte, en las cepas PB1-1, PB1-5 y PB1-6, la fase exponencial se presenta a las 48 h en medio TSC incubadas en condiciones aeróbicas con agitación constante (120 rpm). En ambos casos la temperatura fue de 35°C. Así mismo, los resultados de las pruebas bioquímicas primarias se presentan en la Tabla V.



**Figura 20.**— Curva de crecimiento (densidad óptica (D.O.) vs tiempo) en medio líquido MRS (RL5, C3) y TSC (PB1-1, PB1-5, PB1-6) de las bacterias seleccionadas, inoculadas durante 96 h a 35°C. Los puntos representan la media  $\pm$  D.E.

**Tabla V.**– Pruebas bioquímicas primarias y actividad hemolítica de las cepas seleccionadas.

Cepa	Tinción Gram/ forma	Oxidasa	Catalasa	Formación de esporas	Actividad hemolítica	
					Eritrocitos	Hemocitos
RL5	+/ bacilo alargado	–	–	–	γ	NH
C3	+/ bacilo corto	–	–	–	γ	NH
PB1-1	+/ bacilo corto	–	+	+	γ	NH
PB1-5	+/ bacilo largo	+	+	+	γ	NH
PB1-6	+/ bacilo corto	–	+	+	γ	NH

SH: Sin hemólisis; γ: Sin hemólisis

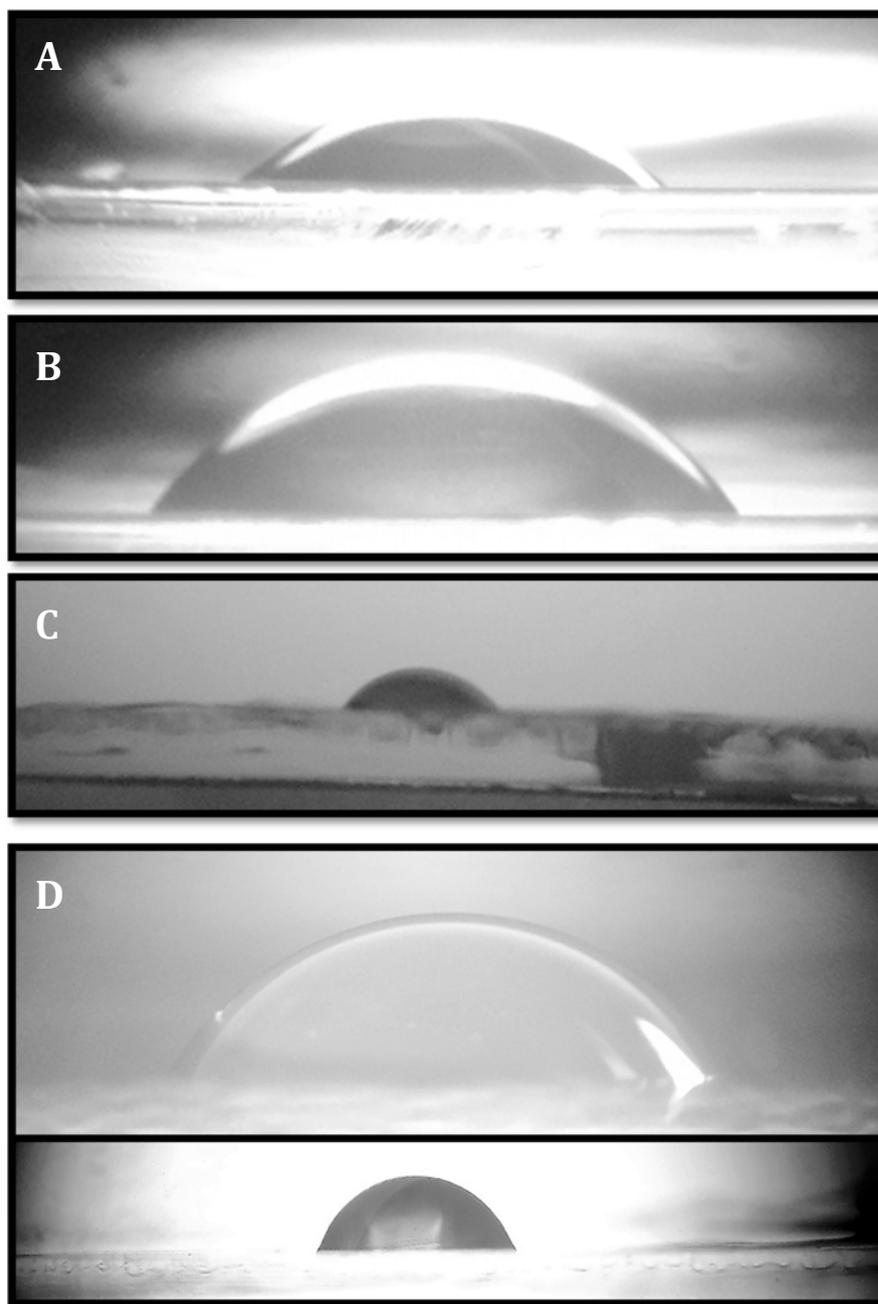
### 7.1.6 Prueba de hidrofobicidad

Todos los aislados seleccionados presentaron coloración rojiza para la prueba de rojo Congo, lo cual indica de manera cualitativa el carácter hidrofóbico de los aislados. Para la prueba BATH, los aislados C3 y PB1-5 presentaron valores de hidrofobicidad por arriba del 70%, lo cual se considera como un buen indicador del carácter hidrofóbico de las cepas. Por el contrario, los valores obtenidos en RL5, PB1-1 y PB1-6 estuvieron por debajo del 30%, lo cual sugiere el carácter hidrofílico de las cepas. Con respecto al resultado del ángulo de contacto (Figura 21), el valor de las cepas C3 y PB1-5 fue mayor a 50° en ambos casos, corroborando su carácter hidrofóbico (Tabla VI).

**Tabla VI.**– Pruebas de hidrofobicidad de la superficie de las bacterias seleccionadas

Cepa	Hidrofobicidad		
	MATH (%)	Rojo Congo	CAM
RL5	26.6	+	42° ± 1.1
C3	73.8	+	54° ± 1.5
PB1-1	28.2	+	44° ± 1.1
PB1-5	71.4	+	78° ± 1.3
PB1-6	1.8	+	-

(+) Resultado positivo. Coloración rojiza de las colonias  
 >50%: Hidrofóbicas; 20-50%: Ligeramente hidrofóbicas; <20%: Hidrofílicas  
 °Angulo ± D.E.



**Figura 21.**– Metodología de ángulo de contacto (CAM) para determinar la hidrofobicidad de las cepas de bacterias seleccionadas; (A) cepa RL5; (B) cepa C3; (C) cepa PB1-1 y (D) cepa PB1-5.

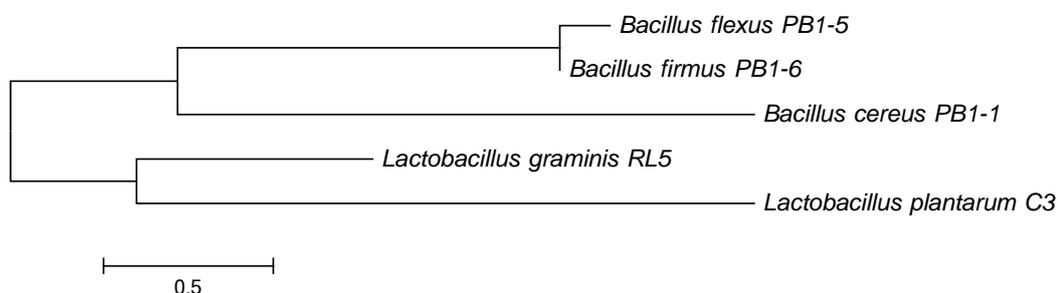
### 7.1.7 Identificación molecular de las cepas aisladas con potencial probiótico

En la Tabla VII se muestran los resultados de la identificación realizada con la amplificación del gen 16S rRNA de cada cepa seleccionada por medio de la PCR y su posterior secuenciación.

**Tabla VII.**– Identificación molecular de cepas seleccionadas, basada en el análisis del gen 16S rRNA.

<b>Cepa</b>	<b>Identidad (%)</b>	<b>Especie</b>
RL5	99.0	<i>Lactobacillus graminis</i>
C3	99.0	<i>Lactobacillus plantarum</i>
PB1-1	99.0	<i>Bacillus cereus</i>
PB1-5	99.0	<i>Bacillus flexus</i>
PB1-6	99.0	<i>Bacillus firmus</i>

La construcción del árbol filogenético basado en las secuencias parciales del gen 16S rRNA construidos con el método neighbor-joining del programa MEGA, se presenta en la Figura 22. El análisis filogenético involucra cinco secuencias de nucleótidos. Todas las posiciones que contienen espacios vacíos y datos perdidos fueron eliminadas. Hubo un total de 417 posiciones en el último conjunto de datos.



**Figura 22.**– Árbol filogenético basado en secuencias de genes de 16S rRNA de las bacterias aisladas. Árbol construido con un análisis de “bootstrap” con 500 réplicas.

## 7.2 PARTE II. Bioensayos *in vivo*

### 7.2.1 Evaluación de las cepas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y composición bioquímica de juveniles de *C. sikamea*

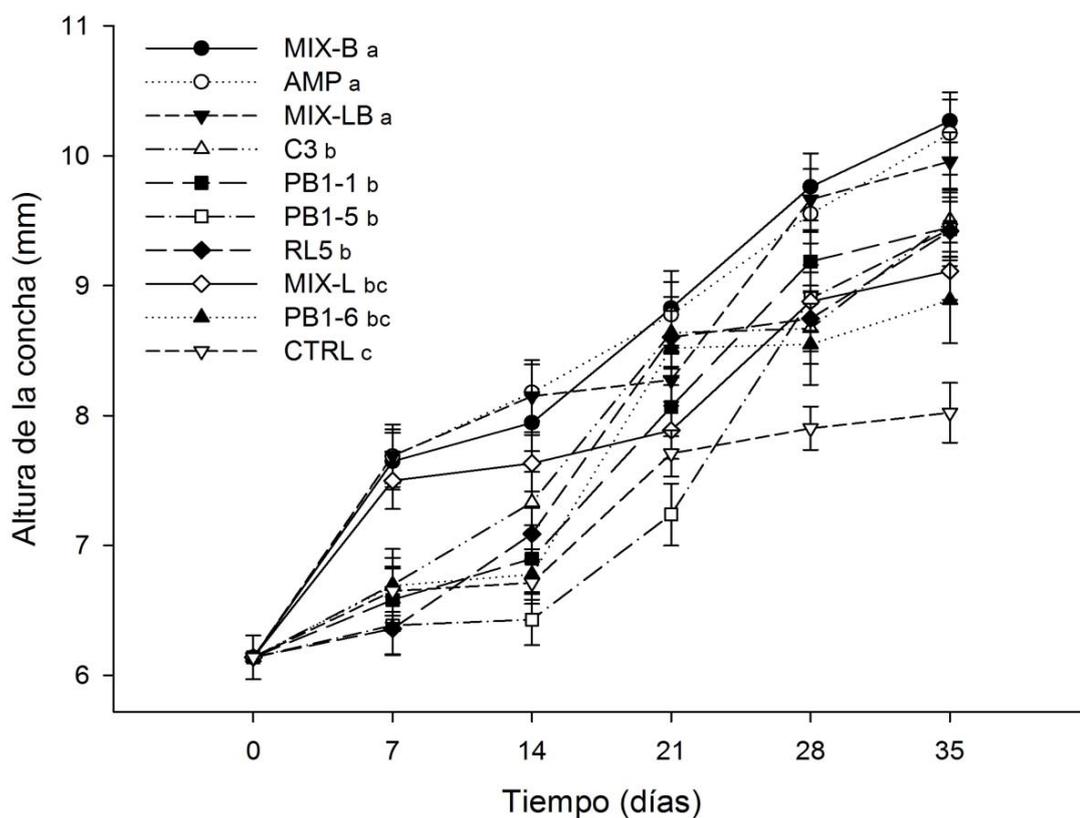
#### 7.2.1.1 Supervivencia

Para juveniles de *C. sikamea* la supervivencia fue del 100% durante los 35 días de tratamiento en un cultivo experimental.

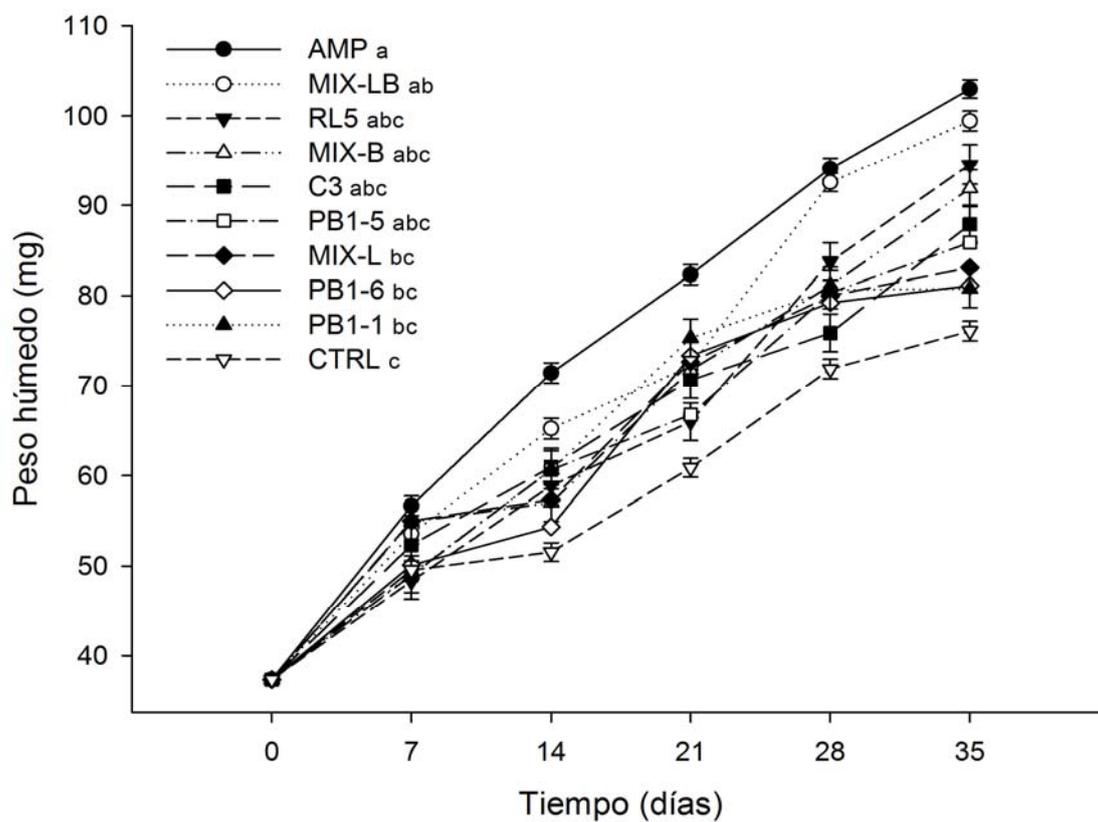
#### 7.2.1.2 Crecimiento

Se encontraron diferencias significativas en el incremento en talla ( $F= 24.7$ ) y peso ( $F= 14.8$ ), así como en las tasas de crecimiento de los juveniles tratados con los diferentes tratamientos de probióticos. Los juveniles crecieron más y más rápido en talla cuando se trataron con MIX-B ( $10.3 \pm 0.1$  mm;  $0.1$  mm  $d^{-1}$ ), AMP ( $10.1 \pm 0.3$  mm;  $0.1$  mm  $d^{-1}$ ) y MIX-LB ( $9.9 \pm 0.2$  mm;  $0.1$  mm  $d^{-1}$ ), comparado con el control ( $8.02 \pm 0.2$  mm;  $0.05$  mm  $d^{-1}$ ) (Figura 23; Tabla VIII). Por el contrario, el crecimiento fue mayor y más acelerado en biomasa húmeda con el AMP ( $103 \pm 0.7$  mg;  $1.8$  mg  $d^{-1}$ ) y MIX-LB ( $99.4 \pm 3.4$  mg;  $1.7$  mg  $d^{-1}$ ), comparados con el grupo control ( $76.1 \pm 2.8$  mg;  $1.1$  mg  $d^{-1}$ ) (Figura 24; Tabla VIII). Respecto al peso seco, los mejores

valores se dieron en juveniles suministrados con PB1-1 ( $72.3 \pm 0.1$  mg) y MIX-B ( $70.3 \pm 0.1$  mg), y los más bajos en el grupo control ( $52 \pm 0.1$  mg) (Tabla VIII).



**Figura 23.**– Crecimiento absoluto para evaluar la altura de la concha de juveniles del ostión Kumamoto *C. sikamea* tratados con las bacterias probióticas seleccionadas. Las líneas y las barras representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos en la leyenda se representan ordenados igual que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).



**Figura 24.**– Crecimiento absoluto para evaluar el peso húmedo de la concha de juveniles del ostión Kumamoto *C. sikamea* tratados con las bacterias probióticas seleccionadas. Las líneas y las barras representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos en la leyenda se representan ordenados igual que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

**Tabla VIII.**– Tasa de crecimiento (altura y peso húmedo) y peso seco de juveniles del ostión Kumamoto *C. sikamea* tratados con los probióticos seleccionados.

Tratamiento	C. sikamea (juveniles)		
	Tasa crecimiento (mm día <sup>-1</sup> )	Tasa crecimiento (mg día <sup>-1</sup> )	Peso seco (mg)
INICIAL	–	–	22.1 ± 0.05
RL5	0.09 ± 0.001	1.6 ± 0.09	68.3 ± 0.02
C3	0.09 ± 0.002	1.4 ± 0.07	65.3 ± 0.1
PB1-1	0.09 ± 0.001	1.2 ± 0.07	72.3 ± 0.1*
PB1-5	0.09 ± 0.003	1.3 ± 0.07	55.7 ± 0.06
PB1-6	0.07 ± 0.004	1.2 ± 0.07	54.7 ± 0.06
MIX-L	0.08 ± 0.001	1.3 ± 0.05	57.3 ± 0.08
MIX-B	0.11 ± 0.001*	1.5 ± 0.03	70.3 ± 0.04*
MIX-LB	0.10 ± 0.001	1.7 ± 0.07*	60 ± 0.05
AMP	0.11 ± 0.004*	1.8 ± 0.08*	60 ± 0.07
CTRL	0.05 ± 0.001	1.1 ± 0.04	52 ± 0.09

Los valores representan la media ± DE. El símbolo (\*) representa diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

### 7.2.1.3 Composición bioquímica

Las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos de los juveniles de la ostra Kumamoto presentaron diferencias significativas ( $F= 43.1$ ;  $F= 29.0$  y  $F= 111.3$ , respectivamente) entre los tratamientos administrados (Tabla IX). Las concentraciones más altas de proteínas se dieron en juveniles tratados con RL5 ( $709.4 \pm 36.2 \text{ mg g}^{-1}$ ) y MIX-L ( $621.9 \pm 23.4 \text{ mg g}^{-1}$ ), comparados con el grupo control ( $440.4 \pm 18.4 \text{ mg g}^{-1}$ ). Con respecto a los niveles de lípidos, las variaciones entre los tratamientos no fueron marcadas, pero si estadísticamente significativas en juveniles tratados con MIX-LB ( $85.6 \pm 1.9 \text{ mg g}^{-1}$ ) y AMP ( $93.3 \pm 0.8 \text{ mg g}^{-1}$ ) y más bajos con el grupo control CTRL ( $33.9 \pm 1.1 \text{ mg g}^{-1}$ ). Finalmente para los carbohidratos, el contenido fue significativamente mas alto ( $47.3 \pm 5.1 \text{ mg g}^{-1}$ ) en los juveniles tratados con MIX-L, comparados a los valores registrados en el grupo control ( $7.0 \pm 1.5 \text{ mg g}^{-1}$ ).

**Tabla IX.**– Composición bioquímica de juveniles del ostión Kumamoto *C. sikamea* tratados con las cepas probióticas seleccionadas.

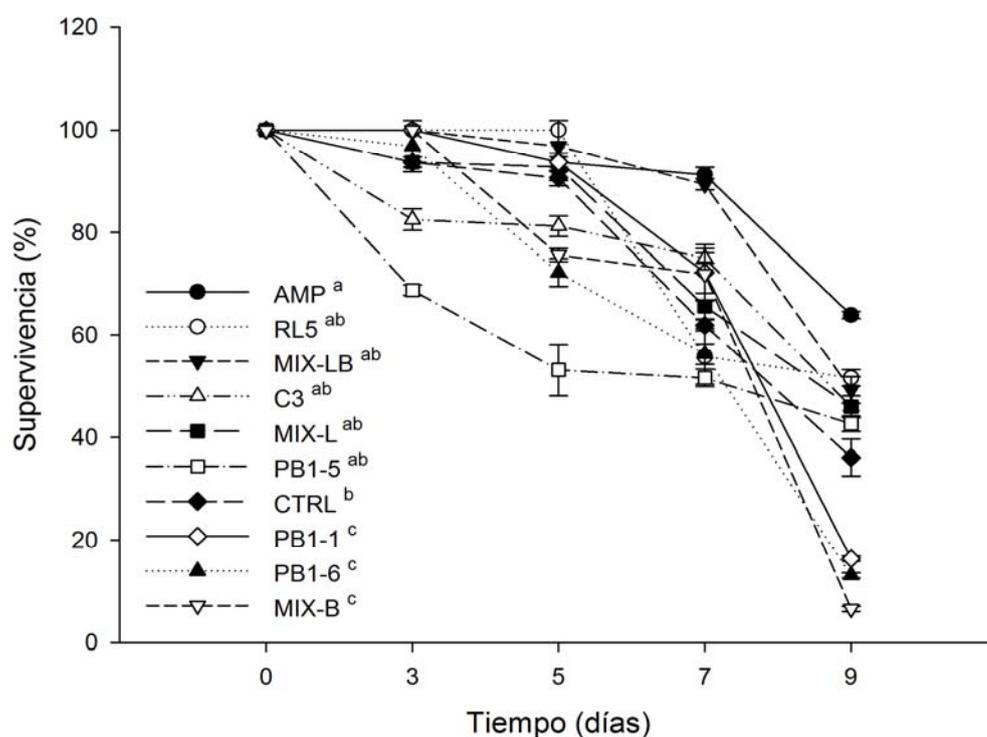
Tratamiento	Concentración (mg g <sup>-1</sup> )		
	Carbohidratos totales	Lípidos totales	Proteínas totales
Antes del tratamiento	10.8 ± 0.2 <sup>e</sup>	83.9 ± 1.9 <sup>ef</sup>	462.8 ± 13.4 <sup>fg</sup>
RL5	15.9 ± 0.5 <sup>de</sup>	66.0 ± 1.4 <sup>dg</sup>	709.4 ± 36.2 <sup>a</sup>
C3	15.3 ± 1.5 <sup>de</sup>	63.2 ± 1.5 <sup>gh</sup>	526.1 ± 18.4 <sup>cdf</sup>
PB1-1	20.2 ± 1.6 <sup>cd</sup>	62.3 ± 0.6 <sup>gh</sup>	305.3 ± 18.3 <sup>e</sup>
PB1-5	12.0 ± 0.5 <sup>e</sup>	56.5 ± 3.0 <sup>h</sup>	468.4 ± 4.8 <sup>dfg</sup>
PB1-6	17.2 ± 1.5 <sup>cde</sup>	78.6 ± 1.1 <sup>cf</sup>	324.2 ± 4.6 <sup>e</sup>
MIX-L	47.3 ± 5.1 <sup>a</sup>	73.8 ± 1.2 <sup>cd</sup>	621.9 ± 23.4 <sup>ab</sup>
MIX-B	14.5 ± 1.4 <sup>de</sup>	83.0 ± 0.4 <sup>ef</sup>	560.5 ± 20.9 <sup>bcd</sup>
MIX-LB	14.5 ± 0.3 <sup>de</sup>	85.6 ± 1.9 <sup>e</sup>	410.3 ± 12.1 <sup>eg</sup>
AMP	27.4 ± 2.2 <sup>c</sup>	93.3 ± 0.8 <sup>a</sup>	582.5 ± 8.6 <sup>bc</sup>
CTRL	7.0 ± 1.5 <sup>b</sup>	33.8 ± 1.1 <sup>b</sup>	440.4 ± 18.4 <sup>fg</sup>

Los valores representan la media ± DE (n = 30). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

### 7.2.2 Evaluación de las cepas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y fijación de larvas de *A. ventricosus*

### 7.2.2.1 Supervivencia

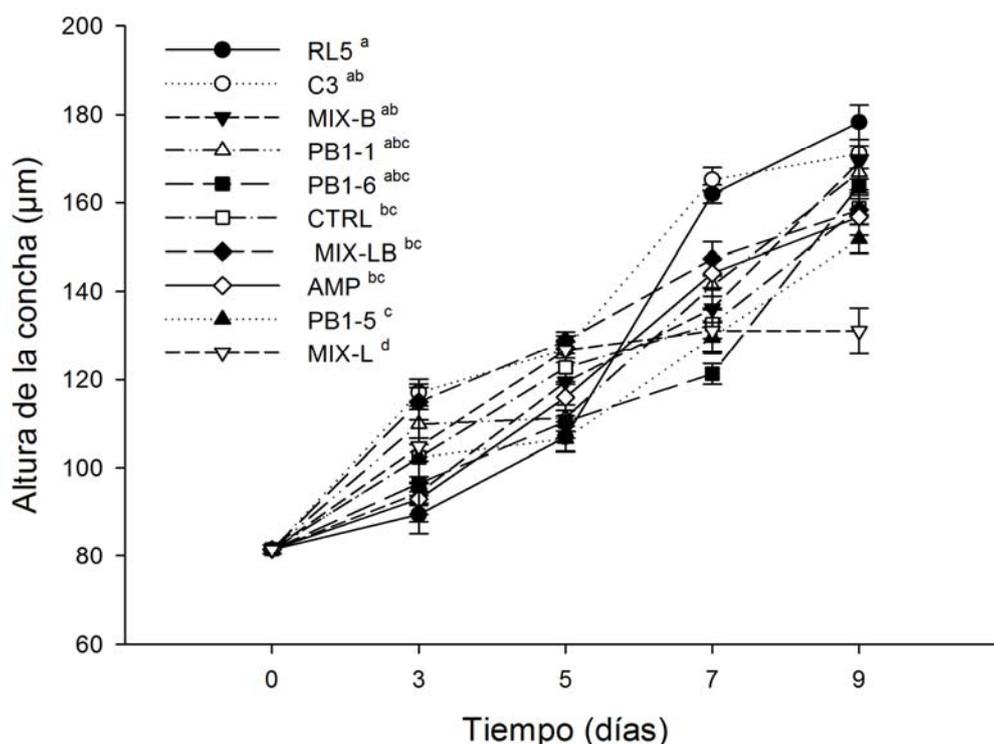
La supervivencia larvaria de *A. ventricosus* presentó diferencias significativas ( $F= 22.6$ ) entre los tratamientos evaluados (Figura 25). Al final del bioensayo (día 9), la mayor supervivencia de larvas se presentó con las cepas RL5 (52%) y la mezcla de cepas MIX-LB (50%), en comparación con el grupo control (36%). El tratamiento con la ampicilina AMP presentó porcentajes de supervivencia mas altos (63%), estos fueron estadísticamente significativos respecto a los grupos tratados con probióticos. Sin embargo en el día 7 los tratamientos MIX-LB y AMP no presentaron diferencias significativas.



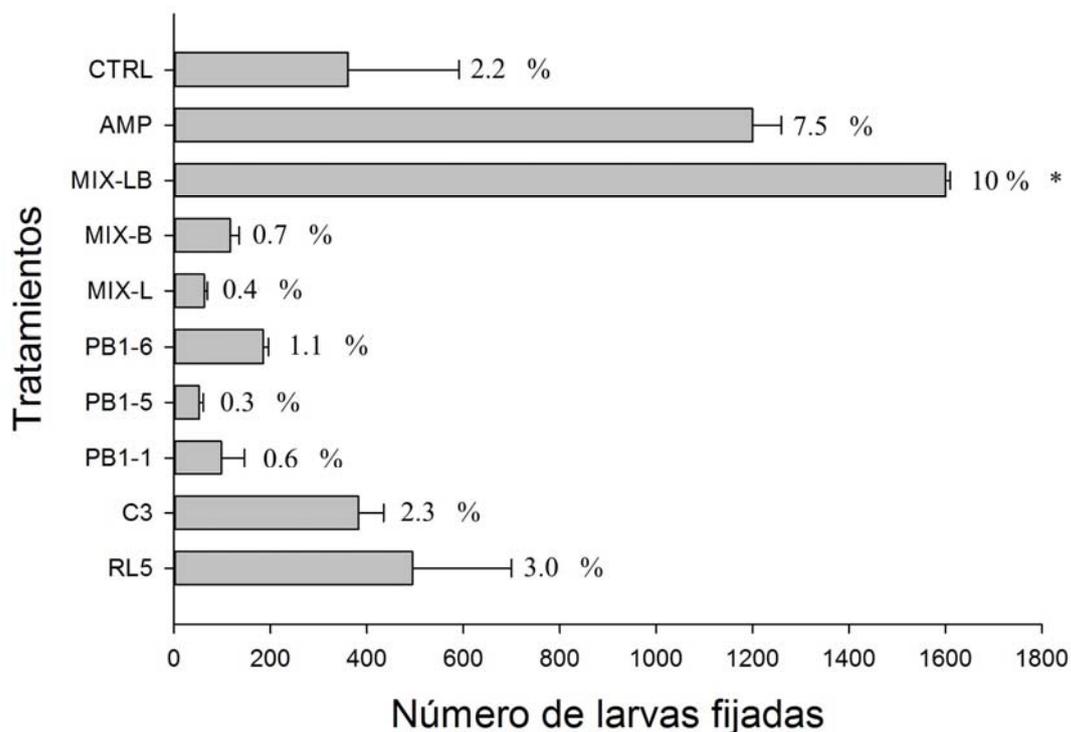
**Figura 25.**– Porcentaje de supervivencia de larvas de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratadas con las cepas probióticas seleccionadas. Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

### 7.2.2.2 Crecimiento absoluto, tasa de crecimiento y fijación larvaria

Se encontraron diferencias significativas ( $F= 18.4$ ) entre los tratamientos evaluados con respecto al crecimiento absoluto (Figura 26) y tasa de crecimiento (Tabla X) de larvas de la almeja Catarina. Al final del bioensayo los valores más de crecimiento más altos y rápidos se obtuvieron con RL5 ( $178 \pm 3.9 \mu\text{m}$ ;  $8 \pm 0.2 \mu\text{m d}^{-1}$ ), comparados con el grupo control ( $158 \pm 3.5 \mu\text{m}$ ;  $6.4 \mu\text{m d}^{-1}$ ) y el MIX-L ( $131 \pm 5.1 \mu\text{m}$ ;  $6.2 \mu\text{m d}^{-1}$ ). Los porcentajes más altos de fijación larvaria ocurrieron con los tratamientos MIX-LB (10%) y AMP (7.5 %), comparados con el grupo control (2.2 %) (Figura 27).



**Figura 26.**– Crecimiento absoluto en la altura de la concha de larvas de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratadas con las cepas probióticas seleccionadas. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 27.**– Asentamiento larvario de larvas de la almeja *Catarina A. ventricosus* tratadas con las bacterias probióticas seleccionadas. Las barras representan la media  $\pm$  DE. y se muestra el porcentaje de fijación. El símbolo (\*) representa diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

**Tabla X.**– Tasa de crecimiento de larvas (altura) y juveniles (altura y peso húmedo) de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratados con los probióticos seleccionados.

Tratamiento	<i>A. ventricosus</i>			
	Larvas	Juveniles		
	Tasa crecimiento ( $\mu\text{m día}^{-1}$ )	Tasa crecimiento ( $\text{mm día}^{-1}$ )	Tasa crecimiento ( $\text{mg día}^{-1}$ )	Peso seco (mg)
INICIAL	-	-	-	$6.6 \pm 0.17$
RL5	$8 \pm 0.2^*$	$0.06 \pm 0.005$	$0.3 \pm 0.05$	$11 \pm 0.10$
C3	$7.4 \pm 0.1$	$0.09 \pm 0.004^*$	$0.6 \pm 0.02^*$	$13 \pm 0.14$
PB1-1	$7.1 \pm 0.2$	$0.07 \pm 0.004$	$0.5 \pm 0.02$	$14 \pm 0.17^*$
PB1-5	$5.8 \pm 0.1$	$0.05 \pm 0.004$	$0.3 \pm 0.01$	$9.3 \pm 0.12$
PB1-6	$6.8 \pm 0.4$	$0.07 \pm 0.004$	$0.6 \pm 0.08^*$	$14 \pm 0.18^*$
MIX-L	$4.1 \pm 0.3$	$0.07 \pm 0.005$	$0.5 \pm 0.05$	$11.3 \pm 0.12$
MIX-B	$7.3 \pm 0.2$	$0.07 \pm 0.003$	$0.4 \pm 0.01$	$12 \pm 0.18$
MIX-LB	$6.4 \pm 0.1$	$0.05 \pm 0.004$	$0.3 \pm 0.02$	$9.3 \pm 0.12$
AMP	$6.2 \pm 0.2$	$0.05 \pm 0.003$	$0.4 \pm 0.02$	$10 \pm 0.13$
CTRL	$6.4 \pm 0.2$	$0.04 \pm 0.004$	$0.5 \pm 0.01$	$11.6 \pm 0.12$

Los valores representan la media  $\pm$  DE. El símbolo (\*) representa diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

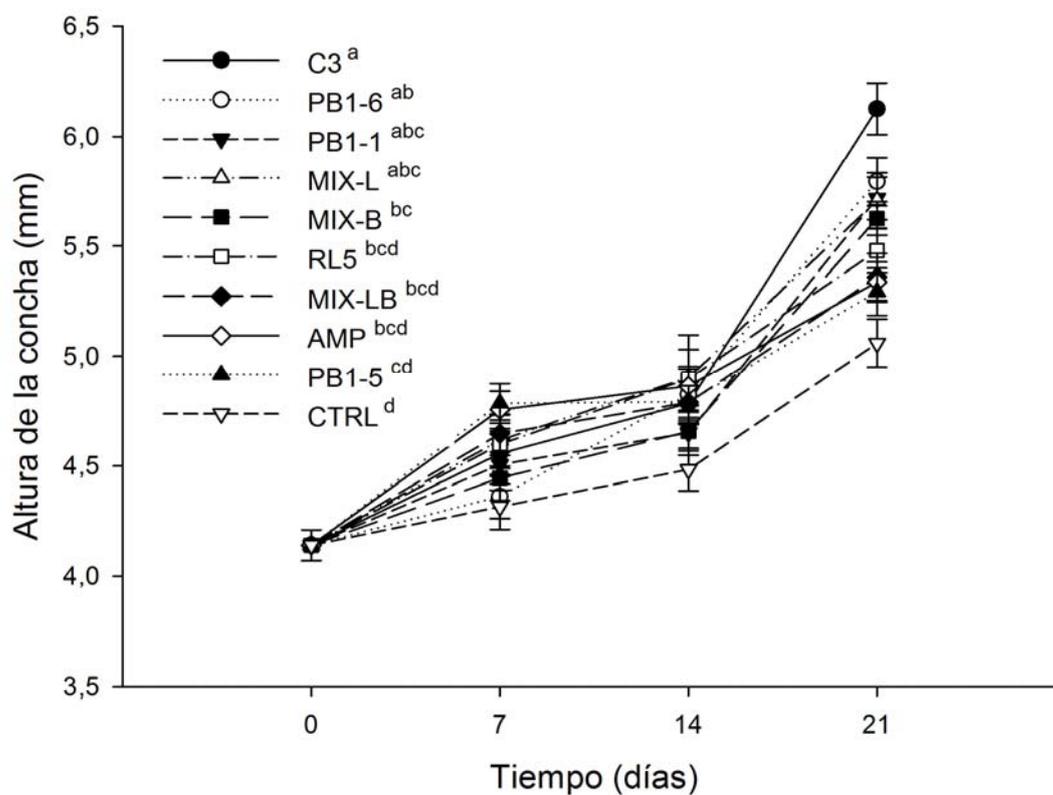
## **7.2.3 Evaluación de las cepas seleccionadas en la supervivencia, crecimiento y composición bioquímica de juveniles de *A. ventricosus***

### **7.2.3.1 Supervivencia**

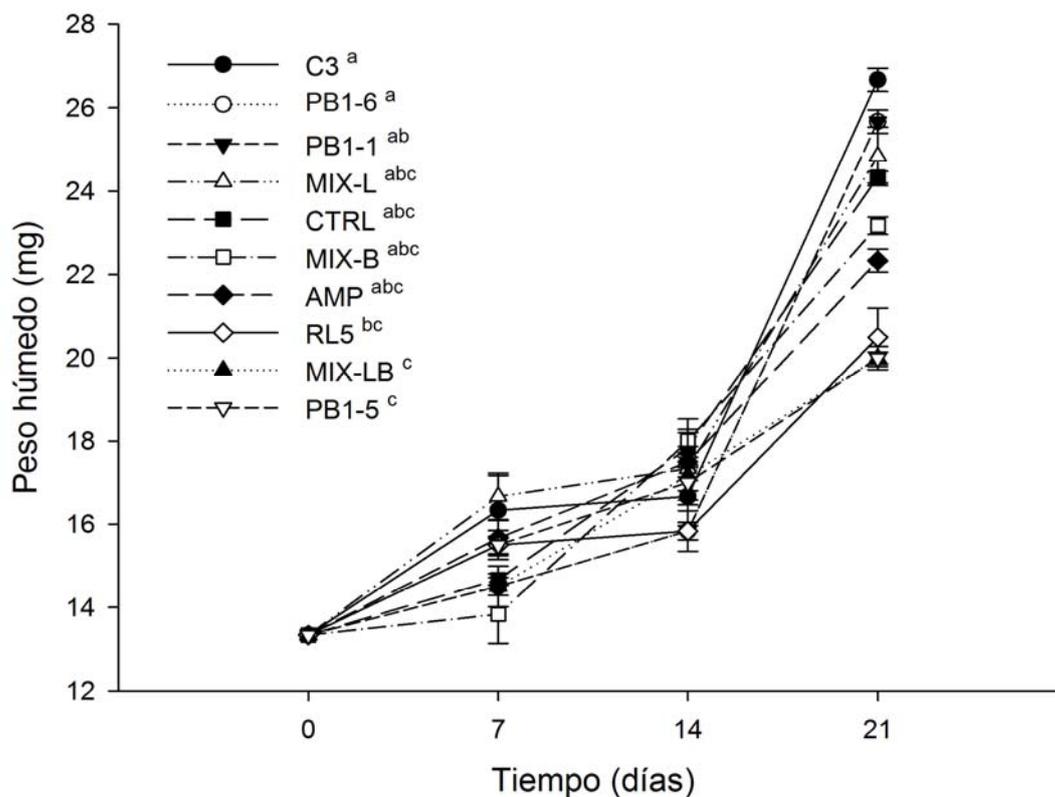
Para juveniles de *A. ventricosus* la supervivencia fue del 100% durante los 21 días de tratamiento en un cultivo experimental.

### **7.2.3.2 Crecimiento absoluto y tasa de crecimiento**

Se encontraron diferencias significativas en el incremento en talla ( $F= 19.0$ ) y peso ( $F= 17.3$ ), así como en las tasas de crecimiento de los juveniles tratados con los diferentes tratamientos de probióticos. Los juveniles crecieron más alto y rápido cuando se trataron con C3 ( $6.1 \pm 0.1$  mm;  $0.05$  mm  $d^{-1}$ ), comparado con el grupo control ( $5.1 \pm 0.1$  mm;  $0.02$  mm  $d^{-1}$ ) (Figura 28; Tabla X). Por el contrario, la mayor y más rápida ganancia en peso húmedo se dio en juveniles tratados con C3 ( $27.6 \pm 0.1$  mg;  $0.7$  mg  $d^{-1}$ ) y PB1-6 ( $26.6 \pm 0.02$  mg;  $0.6$  mg  $d^{-1}$ ), comparado con el grupo control ( $24.3 \pm 0.1$  mg;  $0.5$  mg  $d^{-1}$ ) y PB1-5 ( $20 \pm 0.01$  mg;  $0.3$  mg  $d^{-1}$ ), en donde se encontraron los valores mas bajos (Figura 29; Tabla X).



**Figura 28.**– Crecimiento absoluto en la altura de la concha de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratados con las cepas probióticas seleccionadas. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.



**Figura 29.**– Crecimiento absoluto en el peso húmedo total de juveniles de la almeja *Catarina A. ventricosus* tratados con las cepas probióticas seleccionadas. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

### 7.2.3.3 Composición bioquímica

Las concentraciones de proteínas, carbohidratos y lípidos de los juveniles de la almeja Catarina variaron significativamente ( $F= 135.8$ ;  $F= 14.1$  y  $F= 49.4$  respectivamente) entre los tratamientos administrados (Tabla XI). Las concentraciones más altas de proteínas se dieron en el grupo de juveniles tratados con PB1-1 ( $172.2 \pm 0.6 \text{ mg g}^{-1}$ ), comparados con los del grupo control ( $109.9 \pm 1.1 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que los valores más bajos se encontraron en el tratamiento MIX-LB ( $60.7 \pm 2.1 \text{ mg g}^{-1}$ ). Los niveles de lípidos fueron significativamente más altos en juveniles tratados con C3 ( $68.7 \pm 3.6 \text{ mg g}^{-1}$ ), a comparación del grupo control ( $51.9 \pm 0.05 \text{ mg g}^{-1}$ ) y MIX-B ( $25.03 \pm 3.6 \text{ mg}$ ), donde los valores fueron mínimos. Finalmente, el contenido de carbohidratos fue significativamente más alto en los juveniles tratados con PB1-5 ( $21.9 \pm 0.2 \text{ mg g}^{-1}$ ), mientras que disminuyeron en los juveniles del grupo control ( $12.0 \pm 0.8 \text{ mg g}^{-1}$ ) y en el tratamiento RL5 ( $7.4 \pm 2.03 \text{ mg g}^{-1}$ ).

**Tabla XI.**– Composición bioquímica de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratados con las cepas probióticas seleccionadas.

Tratamiento	Concentración (mg g <sup>-1</sup> )		
	Carbohidratos totales	Lípidos totales	Proteínas totales
Antes del tratamiento	8.2 ± 0.4 <sup>de</sup>	28.4 ± 0.3 <sup>d</sup>	65.3 ± 1.2 <sup>d</sup>
RL5	7.4 ± 2.0 <sup>e</sup>	58.6 ± 1.0 <sup>ab</sup>	107.2 ± 5.4 <sup>c</sup>
C3	13.2 ± 0.6 <sup>cde</sup>	68.7 ± 3.6 <sup>a</sup>	148.8 ± 9.5 <sup>b</sup>
PB1-1	16.9 ± 0.3 <sup>abc</sup>	49.1 ± 0.6 <sup>bc</sup>	172.2 ± 0.6 <sup>a</sup>
PB1-5	21.9 ± 0.1 <sup>a</sup>	43.4 ± 2.6 <sup>c</sup>	141.1 ± 6.9 <sup>b</sup>
PB1-6	15.2 ± 2.5 <sup>bc</sup>	24.4 ± 0.8 <sup>d</sup>	116.9 ± 2.8 <sup>c</sup>
MIX-L	18.7 ± 0.2 <sup>ab</sup>	25.6 ± 2.3 <sup>d</sup>	111.8 ± 1.7 <sup>c</sup>
MIX-B	16.8 ± 0.1 <sup>abc</sup>	25.0 ± 1.7 <sup>d</sup>	71.7 ± 4.4 <sup>d</sup>
MIX-LB	14.2 ± 0.27 <sup>bcd</sup>	53.4 ± 1.3 <sup>bc</sup>	60.7 ± 2.1 <sup>d</sup>
AMP	16.8 ± 4.1 <sup>abc</sup>	46.7 ± 8.3 <sup>bc</sup>	141.2 ± 2.2 <sup>b</sup>
CTRL	12.0 ± 0.8 <sup>bcd</sup>	51.9 ± 0.2 <sup>bc</sup>	109.9 ± 1.1 <sup>c</sup>

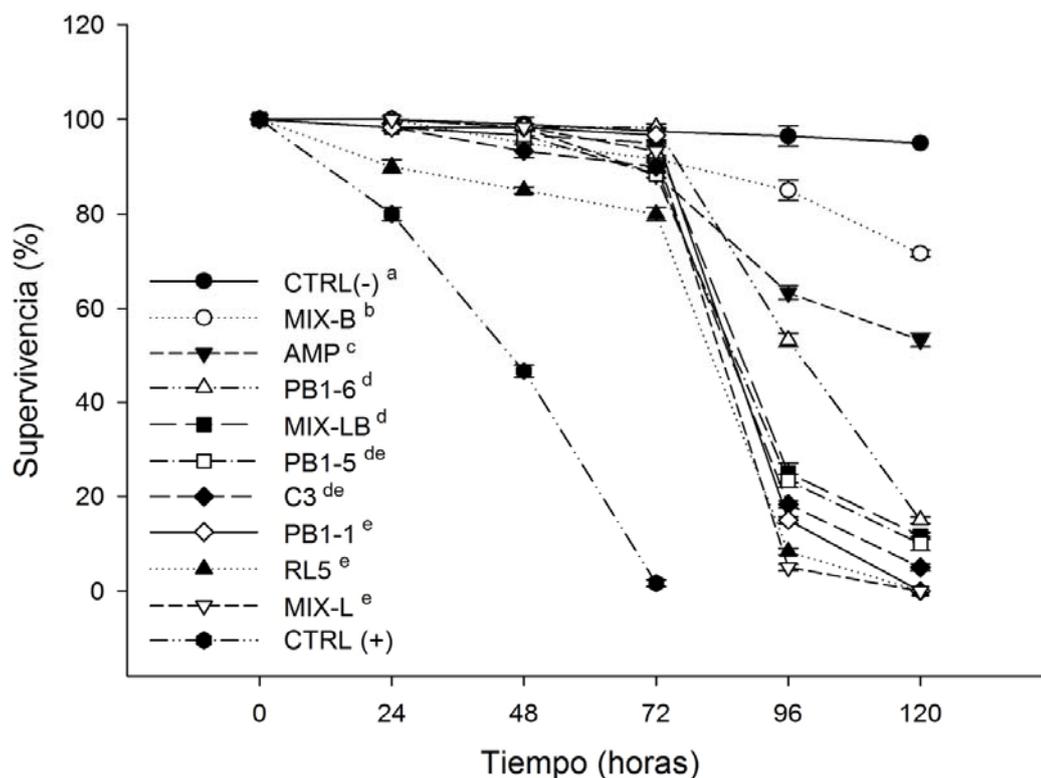
Los valores representan la media ± DE (n = 30). Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

## 7.2.4 Respuesta de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratados con cepas las probióticas seleccionadas y retados con *V. alginolyticus*

### 7.2.4.1 Supervivencia

La supervivencia de los juveniles fue de 0% en el grupo control (+) después de 72 h de exposición a *V. alginolyticus* y significativamente mejoró (>80%; F=

137.8) en todos los juveniles tratados con las bacterias probióticas (Figura 30). Después de 120 h de reto experimental las supervivencias más altas se dieron con el tratamiento MIX-B (72%) y las más bajas con PB1-5, RL5 y MIX-L (0%).



**Figura 30.**– Supervivencia de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratados con las cepas probióticas seleccionadas y retadas con *V. alginolyticus*. CTRL (-) representa a juveniles sin tratamiento y sin retar y CTRL (+) representa a juveniles sin tratamiento y retados. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

#### 7.2.4.2 Actividad de la SOD

Antes de la infección, los juveniles tratados con MIX-B presentaron

significativamente mayor actividad de la enzima SOD ( $P < 0.05$ ;  $78.0 \pm 0.6 \%$ ) que los del grupo control ( $63.7 \pm 0.7 \%$ ) y AMP ( $46.1 \pm 1.8 \%$ ). A las 48 h post-infección se registró un descenso en la actividad de la enzima SOD en la mayoría de los tratamientos, siendo estadísticamente significativo en el grupo control ( $15.3 \pm 0.1 \%$ ) mientras que en los juveniles tratados con MIX-B se registró la mayor actividad de la SOD a las 72 h post-infección ( $P < 0.05$ ;  $82.9 \pm 2.76 \%$ ). La respuesta antioxidante en presencia del patógeno fue más rápida con el tratamiento MIX-B (Tabla XII).

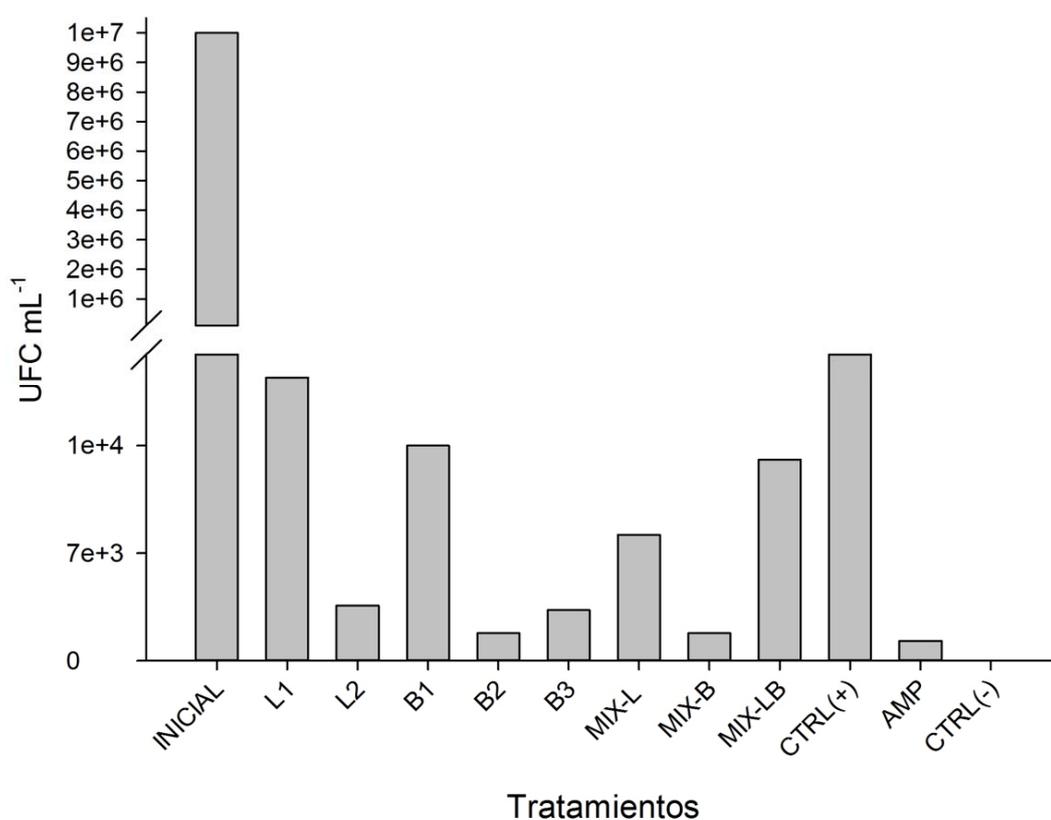
**Tabla XII.**– Actividad de la enzima SOD determinada por el porcentaje de inhibición de la formación del complejo WST-1 (water- soluble tetrazolium) Formazan en juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratados previamente con las bacterias probióticas seleccionadas y posteriormente retados durante 120 h con *V. alginolyticus* (cepa CAIM57).

Tratamiento	Actividad de la SOD (% inhibición)				
	0 h	48 h	72 h	96 h	120 h
RL5	49.4 ± 0.6	53.2 ± 0.2	47.2 ± 0.7	–	–
C3	53.8 ± 0.1	46.1 ± 0.4	16.4 ± 1.2	–	–
PB1-1	50.5 ± 1.6	16.4 ± 1.6*	65.9 ± 1.5	–	–
PB1-5	50.0 ± 1.1	19.2 ± 1.2	50.0 ± 0.3	–	–
PB1-6	51.6 ± 1.1	37.9 ± 2.6	78.0 ± 0.2	55.4 ± 0.6	–
MIX-L	44.5 ± 0.6	58.2 ± 3.1	37.9 ± 0.1	–	–
MIX-B	78.0 ± 0.6*	56.5 ± 0.1	82.9 ± 2.7*	60.4 ± 0.2	40.6 ± 1.9
MIX-LB	60.4 ± 0.3	48.3 ± 1.8	51.6 ± 2.7	–	–
AMP	46.1 ± 1.8	21.9 ± 0.1	30.2 ± 1.1	–	–
CTRL	63.7 ± 0.7	15.3 ± 0.2*	–	–	–

Los valores representan la media ± DE (n= 30). El símbolo (\*) representa diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

### 7.2.4.3 Conteo de bacterias *Vibrio* sp.

Se observó una disminución en el conteo de colonias de *Vibrio* sp. al final del reto (Figura 31), particularmente en el tratamiento probiótico MIX-B ( $1.8 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>) y en AMP ( $1.3 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>). Por el contrario, los mayores conteos se observaron en el control (+) ( $91.0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>) y L1 ( $18.0 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup>).



**Figura 31.**– Conteo de *Vibrio* sp. en placas preparadas con agar tiosulfato citrato bilis sacarosa (TCBS) de muestras de agua de los tratamientos evaluados en el reto.

## 8. DISCUSIÓN

Los bivalvos marinos, por su conducta alimentaria filtradora, concentran una mayor carga bacteriana que otros invertebrados marinos, y muchos de estos microorganismos cuentan con capacidad antibacteriana (Prieur *et al.*, 1990; Castillo *et al.*, 2001; Pellón *et al.*, 2002; De la Rosa y Gamboa, 2004; León *et al.*, 2010), y por ello participan mejorando la nutrición del hospedero, fortaleciendo su sistema de defensa, previniendo la colonización y proliferación de bacterias patógenas (Prieur *et al.*, 1990; Moriarty, 1998), por lo que hacen a este grupo atractivo para el aislamiento de bacterias con potencial probiótico. La mayoría de las cepas bacterianas se han aislado de gónada, intestino, estómago y homogenizados de todo el organismo (Castillo *et al.*, 2001; Pellón *et al.*, 2001; León *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010b; Lim *et al.*, 2011; Karim *et al.*, 2013; Sánchez-Ortiz *et al.*, 2015). En este trabajo se aislaron 109 cepas del TGI de dos especies de bivalvos marinos; 56 cepas de *N. subnodosus* y 53 de *P. sterna*, de las cuales se seleccionaron cinco especies con potencial probiótico, de acuerdo a las características que presentaron en las pruebas *in vitro* y los bioensayos *in vivo*.

### 8.1 Selección de cepas con potencial probiótico: bioensayos *in vitro*

Las cepas aisladas deben poseer efectos probados contra patógenos y las pruebas de antagonismo *in vitro* son una manera preliminar de conocer estos efectos (Balcázar *et al.*, 2006). Se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro* de los aislados bacterianos aislados, contra *V. alginolyticus*, un patógeno reportado para larvas de bivalvos como *A. ventricosus*, *N. subnodosus*, *A. maura* y *C. gigas* (Luna-González *et al.*, 2002). Adicionalmente, los aislados se probaron también contra *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi*, patógenos reportados como responsables de mortalidades de moluscos, peces y crustáceos en sistemas acuícolas (Leyton y Riquelme, 2008; Beaz-Hidalgo *et al.*, 2010). Generalmente, las metodologías más usadas para evaluar la inhibición de bacterias *in vitro* son la difusión en agar con disco y la difusión en agar con pocillos, siendo la más efectiva

la de pocillos en agar por ser una técnica sencilla y menos susceptible a contaminaciones (Vlachos *et al.*, 1999; Rojas *et al.*, 2006; Mayrhofer *et al.*, 2008). En este trabajo se compararon las metodologías de difusión en agar con disco y en agar con pocillos, encontrando que ambas resultaron en diferencias significativas en los halos de inhibición entre cepas. Aunque la técnica de pocillos resultó más susceptible para generar los halos de inhibición, la de discos generó halos de inhibición más grandes como indicio de actividad antagónica por presencia de células bacterianas (célula vs célula) (Yuan Kun, 2006). Con respecto al porcentaje de inhibición relativo calculado para cada cepa aislada, en ambas metodologías se observó que en la prueba de difusión en pozo hubo mejor desempeño en cuanto a que se presenta inhibición contra todos los vibrios y con todas las cepas aisladas, pero la prueba de disco de agar presenta mayores halos de inhibición, indicando fuerte inhibición. Al respecto, se sabe que una acción antibacteriana se considera alta cuando su porcentaje de inhibición relativo es mayor a 70%, intermedia entre el 50-70% y baja cuando es menor a 50% (Ramírez y Díaz, 2007).

Del resultado obtenido en estos bioensayos se seleccionaron dos cepas que tuvieron la mayor actividad antagónica *in vitro* contra las bacterias de *Vibrio* seleccionadas; estas fueron las cepas C3 y RL5, destacando la cepa C3 que inhibió a todos los vibrios, tanto en ausencia, como en presencia de células. Estas cepas presentaron actividad antimicrobiana con amplios halos de inhibición frente a las cuatro especies de *vibrios* usadas en esta prueba (~15 mm diámetro para RL5 y 19 mm para C3). Las pruebas bioquímicas primarias usadas (Gram, catalasa, oxidasa, formación de esporas), los medios de cultivo selectivos utilizados (MRS, Rogosa), así como las condiciones de crecimiento de las cepas (anaerobias facultativas) indicaron que C3 y RL5 eran bacterias ácido lácticas (BAL), y la identificación molecular confirmó que ambas especies corresponden al género *Lactobacillus*. Recientemente Itoi *et al.* (2014) aislaron cerca de 70 cepas de BAL del tracto digestivo de la almeja *Metrix lamarckii* encontrando especies como *Lactobacillus curvatus*, *L. plantarum*, *Lactococcus lactis* y *Pediococcus pentosaceus*. Los autores

concluyen que esta diversidad de LAB en el tracto digestivo de esta almeja se debe a que organismos filtradores como los bivalvos poseen ricos depósitos de cepas marinas LAB. En invertebrados como el abulón *H. gigantea* y el camarón *L. vannamei* se han aislado también cepas de BAL (Lehata *et al.*, 2010; Kongnum y Hongpattarakere, 2012). Al respecto, Vázquez *et al.* (2005) demostraron que la producción de acetato y lactato por parte de bacterias ácido lácticas inhibe el crecimiento de diversas especies de *vibrios*. Así mismo, Campa-Córdova *et al.* (2009a, 2011) evaluaron una cepa bacteriana del género *Lactobacillus* aislada de *N. subnodosus* (NS61), la cual presentó actividad antagónica contra *V. harveyi* y *V. alginolyticus*. Lee *et al.* (2010) aislaron 83 cepas de *Lactobacillus* de muestras homogenizadas de *C. gigas*, encontrando que la mayoría de los aislados presentaron inhibición contra *V. alginolyticus* y *V. proteolyticus*, con halos entre 16 y 18 mm de diámetro. Tamayo *et al.* (2011) utilizaron dos probióticos comerciales en contra de *V. vulnificus*, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, los cuales estaban compuestos por una mezcla de *L. lactis* y *Bacillus subtilis*, y generaron halos de inhibición de 8, 8 y 8.6 mm para las tres especies de *vibrios*, respectivamente.

El aislado C3 fue identificado en este trabajo como *L. plantarum*, el cual ha sido ampliamente usado en diferentes organismos de interés en la acuicultura. Con crustáceos, por ejemplo, se ha reportado que la cepa inhibe el crecimiento de *V. harveyi* (Kongnum y Hongpattarakere, 2012) y *V. anguillarum* (Touraki *et al.*, 2012) y aumenta significativamente la actividad fenoloxidasa (PO) y superóxido dismutasa (SOD), al tiempo que influyó el estallido respiratorio de *L. vannamei*, y contribuyó a la eliminación de *V. alginolyticus* durante infecciones experimentales (Chiu *et al.*, 2007). También se ha reportado una disminución de *vibrios* en rotíferos tratados con un suplemento comercial de *L. plantarum* y esporas de *Bacillus* sp. (Gatesoupe, 2008). Por otro lado, en peces se ha visto que *L. plantarum* inhibe el crecimiento del patógeno *Pseudomonas fluorescens* con halos de inhibición de poco más de 9 mm de diámetro (Abumourad *et al.*, 2013) y disminuye el crecimiento de la bacteria patógena *Aeromonas salmonicida* (Gatesoupe, 1991a). La actividad antimicrobiana

de *L. plantarum* está dada principalmente por una bacteriocina conocida como plantaricina (Mourad, 2007). Al respecto, Kumar *et al.* (2012) evaluaron la actividad antimicrobiana de la plantaricina AS1 de *L. plantarum* frente a diferentes bacterias patógenas y reportaron halos de inhibición de más de 20 mm para *V. parahaemolyticus*, de entre 10 y 20 mm para *V. vulnificus* y *V. fischeri* y de menos de 10 mm para *V. anguillarum*. En el presente trabajo, la cepa C3 presentó los mayores halos de inhibición contra todos los vibrios evaluados, siendo consistentes con lo reportado por los autores mencionados.

Con respecto al aislado RL5, que se identificó como *L. graminis*, el único antecedente de su valor en la acuicultura es de aislados de peces y sedimentos y reporta actividad antimicrobiana con halos de 15 mm y 10 mm frente a *Yersinia ruckeri* y *Lactococcus garvieae*, respectivamente, los cuales son patógenos de salmónidos (Sica *et al.*, 2010). Los autores concluyen que esta cepa, por su capacidad de inhibir los patógenos reportados, podría tener aplicación en el control biológico en la acuicultura de peces. El presente trabajo reporta, por primera vez, actividad antimicrobiana de *L. graminis* frente a *V. alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* y *V. harveyi* (patógenos de bivalvos marinos) y se sugiere como una cepa atractiva para el control de enfermedades causadas por estos vibrios en la acuicultura. También se ha reportado que *L. graminis* presenta actividad antagónica frente a diferentes cepas patógenas, tales como *L. monocytogenes*, *B. cereus* NRRL B-3711, *B. subtilis* NRRL NRS-744, *Y. enterocolitica*, *E. faecalis*, *E. coli* NRRLB-3704, *P. vulgaris* NRRL B-123, *P. aeruginosa* NRRLB-23, *S. typhimurium* NRRL B-4420, *K. pneumoniae*, y *A. hydrophila* (Kivanc *et al.*, 2011).

Siguiendo con los criterios de selección, en este trabajo se desecharon las cepas con actividad hemolítica o hemólisis beta ( $\beta$ ) y alfa ( $\alpha$ ) y se seleccionaron los aislados que no presentaron actividad hemolítica o hemólisis gamma ( $\gamma$ ). Cabe mencionar que la mayoría de las cepas BAL evaluadas no presentaron actividad hemolítica, lo que confirma su estatus de bacterias seguras y reduce la necesidad

de otros ensayos de seguridad biológica (Holzapfel *et al.*, 1998). Adicionalmente, las cepas seleccionadas presentaron resultados negativos de hemólisis en muestras de hemolinfa obtenidas de la almeja mano de león *N. subnodosus*. Todo lo anterior sugiere que las cepas seleccionadas son seguras tanto para el hospedero como para el consumidor final.

En los trabajos con probióticos se busca también que los microorganismos seleccionados (e.g. *Bacillus* spp.) tengan la capacidad de producir enzimas extracelulares como amilasa, celulasa, lipasa y proteasa, las cuales pueden mejorar la digestibilidad de nutrientes y el estado general de salud del hospedero (Balcázar *et al.*, 2006; Boonthai *et al.*, 2011; Moriarty, 1998). En este trabajo se aislaron e identificaron cuatro cepas de *Bacillus* que fueron previamente caracterizadas y seleccionadas mediante pruebas bioquímicas (oxidasa, catalasa, formación de esporas, gram) y aislándolas en TSA mediante la eliminación de células vegetativas para obtener endoesporas. La formación de esporas es una de las características atractivas de este género, debido a que son estables al calor y puede sobrevivir el tránsito a través de la barrera del TGI. Estas propiedades no se pueden asegurar con otras bacterias probióticas que se dan en forma vegetativa, por lo que uso de bacterias formadoras de esporas como probióticos parece estar expandiéndose (ver Hong *et al.*, 2005). De las cepas aisladas, se obtuvieron y seleccionaron tres cepas (PB1-1; PB1-5 y PB1-6), las cuales aunque no presentaron actividad antagónica contra los vibrios seleccionados, produjeron enzimas extracelulares y en muchos de los casos actividad multienzimática de lipasas, amilasas, proteasas y celulasas. Estas cepas fueron posteriormente identificadas molecularmente como *Bacillus cereus*, *B. flexus* y *B. firmus* respectivamente. Cabe resaltar que *B. cereus* presentó amplios halos de hidrólisis en todas las pruebas, lo cual es consistente con lo reportado por Priest (1977) y Tambekar y Dhundale (2012) para síntesis de proteasas, lipasas y amilasas con esta misma cepa. Gil-Turnes *et al.* (1999) reportan que una cepa de *B. cereus* inhibe el crecimiento de *E. coli* e *Y. pseudotuberculosis* después de 24 h en un medio de cultivo. También se ha reportado que cepas de *B.*

*cereus* y *B. subtilis* inhiben el crecimiento de *A. hydrophila* y *V. alginolyticus* y aumentan la actividad de lipasas, leucina arilamidasa y fosfatasa en cultivos del rotífero *Brachionus plicatilis* (Villamil *et al.*, 2011). Recientemente se reportó que la cepa JAQ04 de *B. cereus* inhibe *in vitro* a las cepas patógenas *V. alginolyticus*, *A. hydrophila* y *Pseudomonas putida* y posee un fuerte efecto de antagonismo contra los patógenos (Bernard *et al.*, 2013). Por todo esto, *B. cereus* es considerada una especie de gran importancia como probiótico en la acuicultura (Guillot, 2000). Para *B. firmus* se reportan halos menores de hidrólisis para celulasas y mayores para síntesis de proteasas (Priest, 1977), en tanto que para *B. flexus* la mayor síntesis es de proteasas y amilasas (Tambekar y Dhundale, 2012).

Una de las características más importantes de un probiótico es su capacidad de adhesión al tracto digestivo del hospedero, para asegurar su colonización. Esta característica es un proceso muy complejo, ya que depende de muchas variables, como el tipo de sustrato y las propiedades de las células bacterianas. La adhesión ocurre en dos fases; una inespecífica, basada en fuerzas de atracción y repulsión que impactan sobre la hidrofobicidad de las superficies y permiten iniciar la colonización (Nadell *et al.*, 2009) y la otra específica, ocurre por interacciones entre proteínas de la pared celular de las bacterias que actúan como adhesinas y los receptores de las células epiteliales (Hinsa *et al.*, 2003). La hidrofobicidad de la superficie bacteriana juega un papel importante en la adhesión, debido a que cuanto menos polar es una o ambas superficies involucradas, mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas tienden a establecerse. A pesar de estar cargadas negativamente, la mayoría de las bacterias contienen componentes hidrofóbicos en su superficie (Rosenberg y Kjelleberg, 1986). En este trabajo se evaluó la hidrofobicidad de las cepas seleccionadas, determinando la afinidad de la membrana bacteriana por solventes y la capacidad donadora y aceptora de electrones de la superficie celular, a través de medidas indirectas utilizando las técnicas cuantitativas MATH y CAM. El ángulo de contacto es un método ampliamente usado para medir la hidrofobicidad en microorganismos (Mozes y

Rouxhet, 1987).

Los resultados con el método BATH o MATH muestran que los aislados C3 (*L. plantarum*) y PB1-5 (*B. flexus*) presentan una alta hidrofobicidad, lo cual coincide con lo reportado por Nithya y Halami (2013) referente a los altos valores de hidrofobicidad de la cepa HK1 (*B. flexus*) aislada de diferentes fuentes de alimentos. Los autores sugieren que esta cepa posee un alto potencial de adherencia y capacidad de colonización, lo que puede impedir la colonización de patógenos por el bloqueo específico de los receptores celulares. La metodología BATH o MATH ha sido utilizada en otros trabajos para la selección de microorganismos probióticos aislados de diversos organismos, como la rana toro *Rana catesbeiana* (Pasteris *et al.*, 2009), sedimentos marinos (García-Bernal *et al.*, 2015), los ostiones *C. gigas*, *C. corteziensis* y el callo de hacha *A. maura* (Luna-González *et al.*, 2015), y la almeja pata de mula *Anadara tuberculosa* (Sánchez-Ortiz *et al.*, 2015). Por otro lado, los resultados obtenidos por el método de CAM son consistentes con los obtenidos con MATH y confirman la capacidad hidrofóbica e hidrofílica de las cepas seleccionadas.

En algunos trabajos se ha reportado la comparación entre los métodos MATH y CAM para evaluar la hidrofobicidad de los microorganismos utilizados como probióticos. Por ejemplo, se sabe que solo las células con un ángulo de contacto mayor a 30-40° tuvieron adhesión a hidrocarburos por el método MATH (Van Loosdrecht *et al.*, 1987a, 1987b), sin embargo Reid *et al.* (1992) señalan que la adhesión de *Lactobacillus* sp. a hexadecanos por el método MATH se da cuando el ángulo está por encima de los 60°. Por otro lado, se ha reportado que el ángulo <45° se considera hidrofílico, mientras que el ángulo >45° es hidrofóbico por el método de CAM (Daffonchio *et al.*, 1995). Contrariamente, Díaz (2011) señala que *P. fluorescens* se considera hidrofílica cuando las cepas presentan un ángulo de contacto  $\leq 30^\circ$ . En este trabajo se observó que las cepas C3 (*L. plantarum*) y PB1-5 (*B. flexus*) obtuvieron ángulos mayores a 45°, lo cual se considera hidrofóbico. Este carácter hidrofóbico fue confirmado por el método MATH en donde se obtuvieron

porcentajes mayores a 50% considerándose por tanto hidrofóbicas. Para RL5 (*L. graminis*) y PB1-1 (*B. cereus*) se presentaron ángulos de contacto menores a 50° y un porcentaje menor al 30% con el método MATH, considerándose por tanto hidrofílicas. Al respecto, se reporta que *B. cereus* es eficaz como probiótico, no tanto por su capacidad de adhesión al TGI del hospedero, sino de colonización a este, por lo que su suministro debe ser periódico para que circule a lo largo de todo el TGI bajo una forma viva y activa (Hoa *et al.*, 2000; Duc *et al.*, 2003). Adicionalmente, la metodología de rojo Congo resulto positiva en los aislados, lo que sugiere que las bacterias tienen la habilidad de unirse de manera inespecífica al epitelio del intestino del hospedero por interacciones hidrofóbicas (Flores-Miranda *et al.*, 2012). El colorante rojo Congo es empleado en la identificación de bacterias productoras de celulosa y fimbria agregativa (Zevenhuizen *et al.*, 1986); las fimbrias son apéndices proteínicos presentes en muchas bacterias, utilizados para adherirse a superficies, unas a otras, o a las células animales y las bacterias generalmente producen celulosa como un componente extracelular para facilitar la adhesión de células a tejidos huéspedes (Spiers *et al.*, 2003). Méndez-Ortiz y Membrillo-Hernández (2004), en su trabajo referente a los mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias, mencionan que la coloración roja de las bacterias en la prueba con rojo Congo, se debe a la absorción del colorante por la producción de celulosa y fimbria agregativa. En este trabajo, las cepas C3 y PB1-5 presentaron hidrofobicidad con todas las pruebas realizadas, lo cual es indicativo de su potencial de adhesión al TGI del hospedero. Se ha señalado que el papel de la hidrofobicidad, como un parámetro de la unión no específica en la adhesión bacteriana, esta ampliamente aceptado (Rosenberg y Kjelleberg, 1986), y que los modelos *in vitro* para determinar la adhesión bacteriana son indispensables y ayudan a seleccionar cepas con potencial probiótico (Ouwehand y Salminen, 2003). Se los resultados obtenidos en estudios *in vitro* son difíciles de extrapolar a la situación del TGI del hospedero, donde la adhesión puede ser modificada por el sistema inmune de este y por la competencia por espacio y nutrientes con la microbiota residente y el recambio de la mucosa (Lebeer *et al.*, 2008).

## 8.2 Validación del efecto de las cepas probióticas: bioensayos *in vivo*

Todos los tratamientos con probióticos mejoraron el crecimiento y supervivencia de larvas y juveniles de *A. ventricosus*, y de juveniles de *C. sikamea*, pero lo hicieron de diferente forma en función de la etapa de desarrollo, parámetros analizados y especie evaluada. Algunas de las especies de bacterias seleccionadas en este estudio han sido utilizadas como probióticos en la acuicultura, generalmente en peces y crustáceos, para bivalvos existe poca o nula información de trabajos con estas especies en particular. De las cepas BAL seleccionadas *in vitro* en este estudio la más reportada como probiótico en acuicultura es *L. plantarum* (se describe más adelante), por el contrario *L. graminis* se reporta por primera vez como probiótico para la acuicultura de bivalvos marinos. Por su parte, *B. cereus* se ha reportado con efecto probiótico en el pepino de mar, mejorando su crecimiento y respuesta inmune al ser administrado en consorcio con *B. subtilis* (Li *et al.*, 2014), *B. flexus* en interacción con otras especies de *Bacillus* han mejorado el crecimiento medido como ganancia en peso de camarón blanco *L. vannamei* (Setyati *et al.*, 2014) y *B. firmus* también en consorcio con otras cepas de *Bacillus* han incrementado la supervivencia larvaria de la tilapia del Nilo (Aly *et al.*, 2008a).

En larvas particularmente, los tratamientos con bacterias del género *Lactobacillus* (*L. graminis* o RL5) y (*L. plantarum* o C3), así como las mezclas que las contienen (MIX-LB y MIX-L), promovieron la mayor supervivencia y crecimiento a comparación del grupo control. Consistentemente, otros estudios han reportado que el uso de diferentes especies de *Lactobacillus* favorecen una mejora significativa en la supervivencia larvaria del pectínido *A. purpuratus* (Riquelme *et al.*, 2001), ostión de placer *C. corteziensis* (Campa-Córdova *et al.*, 2011) y lapa *Concholepas concholepas* (Leyton *et al.*, 2012) El efecto benéfico de *Lactobacillus* spp. ha sido reportado ampliamente en el crecimiento y supervivencia de otros grupos zoológicos, como en post-larvas de *Macrobrachium rosenbergii* suministradas con *L. sporogenes* y *L. acidophilus* (Venkat *et al.*, 2004), larvas de cangrejo *Portunus pelagicus* administradas de manera individual o en mezcla con

tres especies de *Lactobacillus* (*L. plantarum*, *L. salivarius* y *L. rhamnosus*) (Talpur *et al.*, 2012), larvas de la dorada *Sparus aurata* suplementadas con *Lactobacillus* sp. (Suzer *et al.*, 2008). Ya se ha señalado que *Lactobacillus* sp. posee características específicas que las hace una de las especies más usadas como probióticos (Balcázar *et al.*, 2006), ya que el mejora el crecimiento por incremento de la disponibilidad de nutrientes y uso de algunos carbohidratos no disponibles, así como por ser productor de pequeñas cantidades de vitamina B (McFarland, 2006) y vitamina K y C (Conway, 2001). En este trabajo, las cepas RL5 y C3 incrementaron significativamente el crecimiento en talla y supervivencia de las larvas de *A. ventricosus*, destacando la cepa RL5 (*L. graminis*). Consistentemente, esta cepa también promovió los mayores porcentajes de crecimiento y supervivencia en larvas de dos especies de bivalvos; en *C. gigas* y *N. subnodosus* (ver ANEXO II y III). Por ello, esta cepa se describe por primera vez como un probiótico potencial en la acuicultura de moluscos bivalvos.

Por otro lado, los miembros del género *Bacillus* administrados en este trabajo, particularmente MIX-B, generaron una disminución drástica de la supervivencia de larvas de *A. ventricosus*, específicamente del día 7 al día 9. El mismo efecto se observó también con esta mezcla en particular de bacterias en larvas de la almeja mano de león *N. subnodosus* (ver ANEXO III). Esto podría indicar que durante los estadios tempranos de desarrollo, las larvas de ambas especies de pectínidos pueden ser susceptibles a la inoculación de esta mezcla en particular. Contrariamente, este mismo tratamiento (MIX-B) incrementó significativamente el crecimiento de las larvas de *A. ventricosus*. Recientemente se observó que las larvas de *A. ventricosus* tratadas con esta misma mezcla (MIX-B) pero en dos concentraciones diferentes ( $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) presentaron diferencias significativas en cuanto a la supervivencia y crecimiento, siendo mejores en la concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> (ver ANEXO IV). Esto sugiere que la dosis empleada con el MIX-B en particular no ocasionó las altas mortalidades al final del bioensayo, pero posiblemente la frecuencia establecida pudo causar estas

mortalidades al final del bioensayo. Sin embargo, se requieren mayores estudios para dilucidar los mecanismos de interacción y posible sinergia entre cepas y determinar la razón por la que MIX-B tiene efectos contrarios entre el crecimiento y supervivencia larvaria en este trabajo.

La relación dosis-efecto de un probiótico se debe determinar cuidadosamente con la finalidad de evitar una sobredosis, lo cual puede resultar en una disminución en su efecto y un incremento en los costos, o contrariamente, usar dosis muy bajas reduce la eficacia del probiótico (Vine *et al.*, 2006). No existe a la fecha un consenso sobre la dosis óptima de probióticos para tratar larvas de bivalvos, y por el contrario, los resultados generados al respecto parecen contradictorios. Por ejemplo, la supervivencia de las larvas de *C. corteziensis* disminuye significativamente si la dosis de *Lactobacillus* sp. (cepa NS61) se eleva de  $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> a  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>, sin embargo esta se mantuvo similar con la mezcla de *P. aeruginosa* (cepa YC58) y *B. cepacia* (cepa Y021) (Campa-Córdova *et al.*, 2011). Se sabe también que las larvas del mejillón *P. canaliculus* crecen significativamente más si se tratan con una mezcla de las cepas 0444 (*Alteromonas macleodii*) y 0536 (*Neptunomonas* sp.) a una dosis de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>, pero sufren elevadas mortalidades a  $1 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2012b). Aunque se ha sugerido que los sistemas de cultivo en acuicultura no soportan concentraciones bacterianas mayores a  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> (Maeda, 1994). Vine *et al.* (2006) señalan que concentraciones de probióticos entre  $1 \times 10^4$  células mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> son suficientes en el agua de cultivo para lograr que las bacterias probióticas se establezcan como parte de la microbiota intestinal del hospedero. Recientemente, se evaluaron dos concentraciones ( $1 \times 10^5$  células mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup>) de las mismas mezclas de cepas probióticas usadas en este trabajo (MIX-B, MIX-L y MIX-LB) en larvas y juveniles de *A. ventricosus* y se observó que la concentración  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> presentó mejores resultados en términos de supervivencia larvaria y crecimiento de juveniles (ver ANEXO IV). Por todo lo anterior y apoyados en otros trabajos (Aguilar-Macías *et al.*, 2010; Abumourad *et al.*, 2013; Genard *et*

*al.*, 2014), en este trabajo se fijó una concentración de  $1 \times 10^6$  células mL<sup>-1</sup> para todos los tratamientos probióticos. Así mismo, la frecuencia de la dosis que se definió en este trabajo fue de 48 h, siendo consistente con lo reportado en otros trabajos recientes con larvas de moluscos, como *C. corteziensis* (Campa-Córdova *et al.*, 2009a; 2011). Aunque en algunos de los trabajos con probióticos realizados con larvas y juveniles de bivalvos (Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008, 2009; Aguilar-Macías *et al.*, 2010; Granados-Amores *et al.*, 2012), peces (Abumourad *et al.*, 2013) y crustáceos (Nimrat *et al.*, 2011; Luis-Villaseñor *et al.*, 2011) se han usado dosis diarias, la decisión de reducirla a la mitad resultó ser efectiva sin sacrificio alguno de la eficiencia, lo cual podría ofrecer una ventaja para la producción de larvas de moluscos en materia de reducción de costos operativos.

A diferencia de los estadios de desarrollo temprano (larvas veliger), el porcentaje de fijación de larvas pediveliger fue significativamente mayor al utilizar el tratamiento MIX-LB (10%) a comparación del grupo control (2%). Entre otros factores, esto podría estar relacionado con la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas o biofilms durante el proceso de asentamiento y metamorfosis larvaria, la cual ha sido bien documentada en moluscos bivalvos (ver Ganesan *et al.*, 2010). Se sabe que las biopelículas favorecen la fijación y el desarrollo juvenil temprano, potenciando la producción de compuestos microbianos y enzimas que mejoran el sistema digestivo e inmune de larvas y postlarvas (Gómez-Gil *et al.*, 2000; Hadfield, 2011). En este estudio la alta hidrofobicidad que presentan las cepas seleccionadas, junto con las combinaciones sinérgicas, pudieron favorecer también la adhesión bacteriana y con esto la formación de biofilms.

Por otro lado, en juveniles de *A. ventricosus* durante la etapa de preengorda, los tratamientos C3 (*L. plantarum*) y PB1-6 (*B. firmus*) fueron los que más favorecieron el crecimiento en talla y peso sobre el control. Por el contrario, en juveniles del ostión Kumamoto *C. sikamea*, las cepas MIX-B y MIX-LB favorecieron en mayor crecimiento en talla y peso. En ambos bioensayos el crecimiento está relacionado con las altas concentraciones de proteínas y lípidos cuantificadas. Esto

confirma las propiedades nutritivas de estas bacterias, como su alto contenido en proteínas y aminoácidos esenciales (Brown *et al.*, 1996). El efecto de los probióticos en el metabolismo de lípidos ha sido estudiado ampliamente en vertebrados superiores, pero no en moluscos, por lo que solo es posible establecer comparaciones cautelosas o plantear hipótesis. Por ejemplo, en experimentos conducidos con ratones, se observó que la administración de una mezcla de *Lactobacillus* ayuda a regular la presencia de las principales cepas bacterianas intestinales relacionadas con el metabolismo de lípidos, lo que resulta en niveles reducidos de colesterol y peso en ratones, así como efectos benéficos sobre la acumulación de lípidos neutros y las actividades antioxidantes (Yue *et al.*, 2014). También en larvas de peces expuestas a la cepa probiótica *Arthrobacter* sp. RSxII se mostró un aumento de la masa seca y la acumulación de lípidos en comparación con los grupos de control, lo que sugiere que la cepa RSxII mejoró la salud general de las larvas por la modificación de su microbiota bacteriana (Plante *et al.*, 2007). En el presente trabajo, la mejora en crecimiento de juveniles de *C. sikamea* por las cepas de *Bacillus* spp. podría explicarse por la capacidad multienzimática que presentan las cepas seleccionadas en este trabajo, que como ya se mencionó, producen proteasas, lipasas, amilasas y celulasas. En *C. sikamea*, las mezclas de bacterias promovieron más el crecimiento que los tratamientos individuales, lo cual resalta la importancia de la sinergia en este tipo de bioensayos (Verschuere *et al.*, 2000). El efecto de la sinergia se ha demostrado en otros trabajos en donde solo mezclas de *Bacillus* spp. (*B. subtilis*, *B. firmus* y *B. flexus*) o mezclas de estos con *Lactobacillus* spp. mejoraron el crecimiento y la condición de juveniles del camarón blanco *L. vannamei* (Setyati *et al.*, 2014) y la mezcla de *Bacillus endophyticus* y *B. tequilensis* también mejoraron el crecimiento de camarón blanco (Luis-Villaseñor *et al.*, 2011). También en la tilapia del Nilo (*Oreochromis niloticus*) se mejoró la supervivencia de larvas usando una mezcla de *B. firmus* y *B. pumilus* (Aly *et al.*, 2008a), así como su respuesta inmune con una mezcla de las bacterias *B. subtilis* y *L. acidophilus* durante un reto contra las bacterias patógenas *A. hydrophila*, *P. fluorescens* y *Streptococcus iniae* (Aly *et al.*, 2008b). Una revisión del uso y beneficio

de *Bacillus* sp. en la acuicultura puede consultarse en Nemutanzhela *et al.* (2014).

Por otro lado, la cepa C3 (*L. plantarum*) ha sido ampliamente usada en la acuicultura como probiótico (ver Abumourad *et al.*, 2013 y Newaj-Fyzul *et al.*, 2014). En la trucha arcoíris *Oncorhynchus mykiss*, por ejemplo, se ha reportado que *L. plantarum* CLFP 238 reduce la mortalidad de larvas (Vendrell *et al.*, 2008), en tanto que la cepa *L. plantarum* NIOFSD018 mejora el crecimiento, la absorción de alimento y la actividad de enzimas como amilasa, proteasas y lipasas en el tracto digestivo de la tilapia del Nilo *O. niloticus* (Essa *et al.*, 2010). También se ha visto que *L. plantarum* reduce la concentración de bacterias heterótrofas marinas e incrementa la concentración de bacterias ácido lácticas en el TGI de *O. niloticus* (Jatobá *et al.*, 2011), y estimula el sistema inmune en esta misma especie (Abumourad *et al.*, 2013). En crustáceos *L. plantarum* reduce las mortalidades y mejora el crecimiento en talla y peso de juveniles de *L. vannamei* después de haber sido retadas con *V. harveyi* (Kongnum y Hongpattarakere, 2012). Sin embargo, en larvas y juveniles de bivalvos no se ha reportado el uso de esta especie como probiótico. El único reporte que se tiene hasta la fecha con bivalvos marinos es con adultos de *C. gigas*, los cuales fueron tratados con la cepa ATCCC8014 de *L. plantarum* durante un proceso de depuración, al final se observó que disminuyen los niveles de la cepa patógena *V. parahaemolyticus* (Xi, 2011). Por lo que ya se ha descrito, este trabajo representa el primero en reportar el uso de *L. plantarum* con efecto benéfico en dos bivalvos marinos de interés comercial.

Los retos experimentales *in vivo* contra patógenos son importantes para la selección de probióticos (Verschuere *et al.*, 2000). En este estudio, se registró un 100% de mortalidad de juveniles (no tratados) de *A. ventriosus* a las 72 h de ser retados con *V. alginolyticus* CAIM57 a una concentración de  $1 \times 10^7$  UFC mL<sup>-1</sup>. De manera similar, Luna-González *et al.* (2002) reportaron altas mortalidades en larvas de *A. ventriosus* y *N. subnodosus* a las 72 h de ser retadas con la misma especie de patógeno, pero diferente cepa (APSA2) a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. La diferencia entre los dos trabajos ocurre debido a la diferencia entre el grado

de virulencia entre cepas de una misma especie de patógeno, la concentración evaluada y el estadio del organismo. Por ejemplo, esta misma cepa (*V. alginolyticus*) a la misma concentración no causó mortalidad en larvas del callo de hacha *A. maura* y *C. gigas* después de 72 h de exposición (Luna-González *et al.*, 2002). Sin embargo, las larvas de *C. gigas* retadas con *V. tubiashii* ATCC19106 a una concentración de  $100 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> sufrieron mortalidades del 100% a las 24 h de ser retadas (Takahashi *et al.*, 2000), y después de 48 h de ser retadas con el patógeno *V. coralliilyticus* utilizando una concentración de  $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> (Genard *et al.*, 2013). Así mismo, en larvas de *A. purpuratus* se observó una elevada mortalidad a las 48 h de ser retadas con *V. splendidus* VPAP18 a una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> (Rojas *et al.*, 2015).

En el presente trabajo, todos los tratamientos probióticos protegieron a los juveniles de la almeja Catarina infectados con *V. alginolyticus* (CAIM57) hasta 72 h post-infección, pero de manera más relevante la mezcla de *Bacillus* spp. (MIX-B) que lo hizo hasta las 120 h post-infección. Por ejemplo una mezcla de *B. licheniformis* y *B. subtilis* mejora la resistencia contra *V. alginolyticus* activando el sistema inmune no específico del camarón *Penaeus japonicus* (Zhang *et al.*, 2011). También se logró que una mezcla de *L. delbrueckii* y *B. subtilis* incrementara la actividad fagocítica de la dorada *Sparus aurata* (Salinas *et al.*, 2005). Sin embargo, en bivalvos marinos no existen estudios que reporten este efecto protector ante retos experimentales utilizando mezclas de bacterias probióticas y solo se han evaluado cepas de manera individual con la lapa *C. concholepas* tratada con *B. pumilus* (Leyton *et al.*, 2012), el abulón *H. midae* tratado con la cepa SY9 de *Bacillus* sp. (Macey y Coyne, 2005), y el ostión del Atlántico *C. virginica* tratado con la cepa RI06-95 de *B. pumilus* y retado con *V. tubiashii* (Karim *et al.*, 2013).

Aunque ninguna de las tres cepas de MIX-B (individual o en mezcla) posee actividad antagónica *in vitro* contra la cepa CAIM57 de *V. alginolyticus*, su combinación fue la que mayor protección confirió a los juveniles de *A. ventricosus*. De manera similar, Karim *et al.* (2013) reportan que la cepa RI06-95 de *B. pumilus*

carece de respuesta antagónica ante *V. tubiashii*, pero mejora significativamente la supervivencia de juveniles de *C. virginica*. Estos hallazgos sugieren que la protección que confiere al hospedero un determinado tratamiento probiótico, solo o combinado, podría provenir de la estimulación de su sistema inmune, más no necesariamente de la acción de compuestos antimicrobianos específicos (Verschuere *et al.*, 2000; Kesarcodi-Watson *et al.*, 2008). En apoyo a las altas supervivencias observadas durante el reto, en el grupo tratado con MIX-B en particular se evidenciaron dos aspectos importantes: 1) la actividad de la SOD se incrementó significativamente en los juveniles tratados con esta mezcla, antes y después de la infección, y por el contrario, disminuyó en el grupo control y en los tratamientos con el antibiótico, como un posible reflejo de estrés oxidativo, y 2) las concentraciones de *Vibrio* disminuyeron al final del reto, comparado con el grupo control y otros tratamientos. Al respecto, parece claro que cuando las bacterias patógenas entran al cuerpo de los bivalvos se desencadenan una serie de respuesta del sistema inmune, como producción de enzimas hidrolíticas, factores antimicrobianos y especies reactivas de oxígeno (EROs), con la finalidad de neutralizar y destruir a los agentes invasores (Vargas-Albores y Barracco, 2001). Para neutralizar efectos no deseados, existen enzimas protectoras o antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD). En bivalvos se han identificado un gran número de enzimas antioxidantes y su respuesta se ha evaluado en retos contra patógenos o en estudios sobre estrés al medio ambiente. La SOD juega un papel crucial en la defensa de bivalvos (Song *et al.*, 2010), llevando al incremento o disminución de su actividad (Matsuda *et al.*, 2003). Al respecto y en apoyo a esto González y Arenas (2002) concluyen que la actividad SOD y la producción de anión superóxido en hemocitos de *A. purpuratus* podría ser utilizada para evaluar la capacidad del sistema inmune en moluscos. La importancia de la SOD en la respuesta inmune, así como el papel que desempeña en la protección de las células en diferentes retos se ha reportado en adultos de *H. diversicolor* (Shu-hong *et al.*, 2004) que fueron retados con *E. coli* o *V. parahaemolyticus*; en *N. subnodosus* (Estrada *et al.*, 2007), en donde se evaluó la actividad de la SOD en tejidos durante

el efecto del dinoflagelado tóxico *Gymnodinium catenatum*; en *Mytilus galloprovincialis* (Vlahogianni *et al.*, 2007) durante una exposición a metales pesados; en *Chlamys farreri* (Xing *et al.*, 2008) durante la infección del virus AVNV (Acute virus necrobiotic virus); en juveniles de *C. corteziensis* (Campa-Córdova *et al.*, 2009a, 2009b), durante la exposición a cepas probióticas y oxitetraciclina y la exposición a un dinoflagelado tóxico (*Prorocentrum lima*), respectivamente; en *P. sterna* (Granados-Amores *et al.*, 2012) en donde se administraron probióticos naturales y comerciales; en larvas de *Pecten maximus* (Genard *et al.*, 2014), en este trabajo los autores evalúan la actividad de la SOD en tratamientos con cepas probióticas durante un reto con *V. aestuarianus*, *V. coralliilyticus*, *V. splendidus* y *V. pectenocida*, y finalmente Le Bris *et al.* (2015) expusieron a organismos adultos de la almeja *Venerupis philippinarum* a un reto contra el patógeno *V. tapetis* (cepa CECT4600T) causante de la enfermedad del anillo café y otra cepa de la misma especie de *Vibrio* (LP2) pero menos virulenta y evaluaron la respuesta inmune determinando la actividad de la SOD en manto y hemolinfa durante 30 días post-infección, concluyen que la actividad de la enzima puede variar dependiendo de condiciones ambientales que interactúan directamente con el patógeno, es decir, la respuesta de SOD esta modulada por la interacción del patógeno y las condiciones del medio que lo rodea, particularmente la temperatura. Posteriormente y en continuación del trabajo de Le Bris *et al.* (2015) se evaluó a la misma especie de almeja con las mismas cepas de *Vibrio* y la misma enzima durante el reto pero combinando diferentes temperaturas (15 y 22°C), y concluyen que el sistema inmune de la almeja puede ser mejorado a 22°C ya que la virulencia de *V. tapetis* disminuye, y la actividad de la SOD se incrementa (Richard *et al.*, 2015).

Por otro lado, la disminución en la actividad de la SOD asociada al uso de antibióticos ha sido reportada con la oxitetraciclina en juveniles de *C. corteziensis* (Campa-Córdova *et al.*, 2009), el cloranfenicol en larvas de *P. maximus* (Genard *et al.*, 2014) y la ampicilina en juveniles de *A. ventricosus* (en este estudio). Una posible explicación a este hecho puede ser que la dosis del antibiótico usada

causara una modificación de la microbiota endógena, lo cual está apoyado por Wolowczuk *et al.* (2008), quienes señalan que la microbiota intestinal endógena y los factores ambientales juegan un papel central en la modulación del sistema inmune. Además, Ren *et al.* (2014) reportan que la estimulación o supresión de la actividad de SOD depende de la concentración administrada del antibiótico. Sin embargo, la ampicilina, que es un antibiótico usado en acuicultura (Park *et al.*, 2012), favoreció el incremento en la supervivencia de los juveniles durante el reto en este trabajo, sugiriendo un efecto bactericida del antibiótico, mas que la estimulación del sistema inmune, como se ha reportado en algunos casos (Thakur *et al.*, 2003). En apoyo a esto, junto con la poca actividad de la SOD, el conteo de *Vibrio* al final del reto disminuyó con respecto al control y otros tratamientos con probióticos. Este mismo efecto benéfico del antibiótico se ha observado con el florfenicol en el cultivo intensivo del pectínido *A. purpuratus* (Miranda *et al.*, 2013), con el cloranfenicol y eritromicina en juveniles de *A. ventricosus* (Campa-Córdova *et al.*, 2005) y larvas de *P. maximus* (Robert *et al.*, 1996). Opuesto a esto, en este trabajo el crecimiento se vio afectado en las larvas y juveniles de *A. ventricosus* evaluadas con el antibiótico, al respecto Miranda *et al.* (2013) reportan que la oxitetraciclina produce una alta mortalidad y pobre crecimiento de larvas de *A. purpuratus*. Este efecto adverso del antibiótico puede estar relacionado con la interacción bacteria-microalga (Campa-Córdova *et al.*, 2006).

Dadas las características *in vitro* de las cepas aisladas del TGI de *N. subnodosus* y *P. sterna*, su utilización en bioensayos *in vivo* contribuye a incrementar el valor de las investigaciones sobre bacterias marinas probióticas aisladas de bivalvos marinos, y constituyen una potencial herramienta para incrementar la supervivencia y crecimiento de bivalvos marinos y muy posiblemente en otros grupos zoológicos de potencial interés comercial en la acuicultura. Así mismo, durante los bioensayos *in vivo* todos los tratamientos con probióticos confirieron un grado diferente de beneficio con respecto al grupo control, particularmente las cepas RL5, C3 y la mezcla de lactobacilos MIX-LB con larvas,

las cepas C3 y PB1-6 con juveniles, y la mezcla de bacilos MIX-B durante el reto experimental de juveniles con *V. alginolyticus*. Los resultados obtenidos sugieren que la eficiencia y modo de acción de un probiótico puede variar entre cepas de una misma especie, generar en un mismo hospedero respuestas diferentes en función de su estadio de desarrollo ontogenético y proveer diferentes tipos de protección contra patógenos, incluyendo antagonismo y exclusión, mejor asimilación de nutrientes y fortalecimiento general del sistema inmune innato. Finalmente, se recomienda profundizar en el estudio de los mecanismos de acción de las cepas que mejores resultados ofrecieron, especialmente a nivel molecular y genómico, así como evaluar mezclas en diferente dosis/proporción y repetición en *A. ventricosus*, *C. sikamea* y otros bivalvos de interés acuícola comercial, para en un futuro poder evaluar las cepas en cultivos a una escala comercial.

## 9. CONCLUSIONES

- Las dos cepas de *Lactobacillus* presentaron fuertes halos de *inhibición in vitro* contra los vibrios patógenos, particularmente *L. graminis* que se reporta por primera vez como antagónica a *V. alginolyticus* CAIM 57, *V. harveyi* CAIM 1793, *V. vulnificus* CAIM 157, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802.
- Las tres cepas de *Bacillus* presentaron actividad multi-enzimática *in vitro*, especialmente la cepa PB1-1 (*B. cereus*) con amplia hidrólisis de caseína y gelatina (proteasas); tween 80 (lipasas); almidón (amilasas) y celulosa (celulasas).
- Las cepas C3 (*L. plantarum*) y PB1-5 (*B. flexus*) presentaron los más altos porcentaje de hidrofobicidad, relacionándose fuertemente los resultados obtenidos en las metodologías MATH y CAM, indicando un alto potencial de adhesión.
- Todos los tratamientos con probióticos evaluados *in vivo* confirieron un grado diferente de beneficio con respecto al grupo control, las cepas RL5, C3 y la mezcla de lactobacilos MIX-LB con larvas, las cepas C3 y PB1-6 con juveniles y la mezcla de bacilos MIX-B durante el reto experimental de juveniles con *V. alginolyticus*.
- Las cepas RL5 (*L. graminis*) y C3 (*L. plantarum*) confirieron los mejores valores de crecimiento y supervivencia en larvas de *A. ventricosus*, mientras que la mezcla de *Lactobacillus* spp. y *Bacillus* spp. favoreció la fijación larvaria de *A. ventricosus*.
- Las cepas C3 y PB1-6 favorecieron el mayor crecimiento en talla y peso en juveniles de *A. ventricosus* y *C. sikamea*, coincidente con el mayor aumento en los niveles de proteínas, lípidos y carbohidratos en la biomasa húmeda.

- La supervivencia de los juveniles de ambas especies no presento diferencias significativas con respecto al control, y en ambos casos fue del 100% al final de los bioensayos.
- Todos los tratamientos probióticos evaluados confirieron alta protección a los juveniles de *A. ventricosus* retados con el patógeno *V. alginolyticus* (CAIM57), presentando altas tasas de supervivencia a las 72 h post-infección, especialmente la mezcla de *Bacillus* spp. (MIX-B) que presentó altas tasas de supervivencia hasta las 120 h post-infección.
- Las cepas de *Bacillus* spp. (en mezcla y de forma individual) no presentaron actividad antagonica *in vitro* contra los *Vibrios* evaluados, a excepción del tratamiento MIX-B que confirió la mayor protección durante el reto y generó los mayores niveles de SOD y una significativa disminución de colonias de *Vibrio*, sugiriendo la estimulación del sistema inmune.
- Los resultados obtenidos sugieren que la eficiencia y modo de acción de un probiótico puede variar entre cepas de una misma especie, generar en un mismo hospedero respuestas diferentes en función de su estadio de desarrollo ontogénico y proveer diferentes tipos de protección contra patógenos, incluyendo antagonismo y exclusión, mejor asimilación de nutrientes y fortalecimiento general del sistema inmune innato.

## 10. LITERATURA CITADA

- Abasolo-Pacheco, F., J.M. Mazón-Suástegui, P.E. Saucedo. 2009. Response and condition of larvae of scallops *Nodipecten subnodosus* and *Argopecten ventricosus* reared at the hatchery with different seawater source. *Aquaculture* 296(3):255-262.
- Abumourad, I.M.K., W.T. Abbas, E.S. Awaad, M.M.N. Authman, K. El-Shafei, O.M. Sharaf, G.A. Ibrahim, Z.I. Sadek, H.S. El-Sayed. 2013. Evaluation of *Lactobacillus plantarum* as a probiotic in aquaculture: Emphasis on growth performance and innate immunity. *J Appl Sci Res.* 9:572-582.
- Acebo-González, D., A.T. Hernández-García. 2013. Los métodos Turbidimétricos y sus aplicaciones en las ciencias de la vida. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* 44:1.
- Aguilar Macías, O.L., J.J. Ojeda-Ramírez, A.I. Campa-Córdova, P.E. Saucedo. 2010. Evaluation of natural and commercial probiotics for improving growth and survival of the pearl Oyster, *Pinctada mazatlanica*, during late hatchery and early field culturing. *J World Aqua Soc.* 41(3):447-454.
- Aly, S.M., A.M. Abd-El-Rahman, G. John, M.F. Mohamed. 2008a. Characterization of some bacteria isolated from *Oreochromis niloticus* and their potential use as probiotics. *Aquaculture* 277(1):1-6.
- Aly, S.M., Y.A.G. Ahmed, A.A.A. Ghareeb, M.F. Mohamed. 2008b. Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of *Tilapia nilotica* (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. *Fish Shellfish Immun.* 25(1):128-136.
- Angulo, F. 2000. Antimicrobial agents in aquaculture: potential impact on public health. *Alliance for the Prudent Use of Antibiotics (APUA) Newslett.* 18:1-4.
- Araya, R., M. Jorquera, C. Riquelme. 1999. Asociación de bacterias al ciclo de vida de *Argopecten purpuratus*. *Rev Chil His Nat.* 72:261-71.
- Austin, B., L.F. Stuckey, P.A.W. Robertson, I. Effendi, D.R.W. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J Fish Dis.* 18(1):93-96.

- Avendaño-Herrera, R., M. Lody, C. Riquelme. 2005. Producción de sustancias inhibitorias entre bacterias de biopelículas en sustratos marinos. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 40(2):117-125.
- Ariffin, H., N. Abdullah, M.S. Umi Kalsom, Y. Shirai, M.A. Hassan. 2006. Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3. *International Journal Engineering Technology* 3(1):47-53.
- Balcázar, J.L., I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuela, D. Cunningham, D. Vendrell, J.L. Múzquiz. 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol.* 114(3):173-186.
- Balcázar, J.L., D. Vendrell, I. De Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J.L. Múzquiz, O. Girones. 2008. Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture* 278(1):188-191.
- Baqueiro, C.E. 1984. Status of molluscan aquaculture on the Pacific coast of Mexico. *Aquaculture* 39(1):83-93.
- Bairagi, A., K.S. Ghosh, S.K. Sen, A.K. Ray. 2002. Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquacult Int.* 10(2):109-121.
- Bari, H., D. Lam, K. Fried. 2010. *Pearls*. Rizzoli, New York. 336 pp.
- Barnes, H., J. Blackstock. 1973. Estimation of lipids in marine animals and tissues: detailed investigation of the sulphophosphovanillin method for total lipids. *J Exp Mar Biol Ecol.* 12(1):103-118.
- Bartholomew, J.W., T. Mittwer. 1950. A simplified bacterial spore stain. *Biotec. Histochem.* 25(3):153-156.
- Beaz-Hidalgo, R., S. Balboa, J. Romalde, M.J. Figueras. 2010. Diversity and pathogenicity of *Vibrio* species in cultured bivalve mollusks. *Environ Microbiol Rep.* 2(1):34-43.
- Bernard, V.H., A. Nurhidayu, M.Y. Ina-Salwany, Y. Abdelhadi. 2013. *Bacillus cereus*; JAQ04 Strain as a Potential Probiotic for Red Tilapia; *Oreochromis* Species. *Asian J Anim Vet Adv.* 8:395-400.
- Boonthai, T., V. Vuthiphandchai, S. Nimrat. 2011. Probiotic bacteria effects on growth and bacterial composition of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquacult Nutr.* 17(6):634-644.

- Borrego, J.J., D. Castro, A. Luque, C. Paillard, P. Maes, M.T. García, A. Ventosa. 1996. *Vibrio tapetis* sp. nov., the causative agent of the brown ring disease affecting cultured clams. *Int J Syst Bacteriol.* 46(2):480-484.
- Bourne, N., C.A. Hodgson, J.N.C. Whyte. 1989. A manual for scallop culture in British Columbia. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences no. 1694, 215 p.
- Brown, M.R., S.M. Barrett, J.K. Volkman, S.P. Nearhos, J.A. Nell, G.L. Allan. 1996. Biochemical composition of new yeasts and bacteria evaluated as food for bivalve aquaculture. *Aquaculture* 143(3):341-360.
- Burckhardt, W. 1985. Determination of the wetting characteristics of peat soils extract by contact angle measurements. *Z Pflanz Boden.* 148:66-72.
- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans, Y. Guerrero-Rentería. 2012. Early Gametogenesis of Kumamoto oyster (*Crassostrea sikamea*). *Hidrobiologica* 22(2):181-184.
- Cáceres-Martínez, J., R. Vásquez-Yeomans. 2013. Enfermedades, parásitos y episodios de mortalidad de ostiones de importancia comercial en México y sus implicaciones para la producción. *Cienc Pesq.* 21:5-48
- Cáceres-Puig, J.I., C. Cáceres-Martínez, P.E. Saucedo. 2009. Annual reproductive effort of Pacific winged pearl oyster *Pteria sterna* and its relation with the timing for planning pearl seeding operations. *J Shellfish Res.* 28(3):471-476.
- Cáceres-Puig, J.I., L. Huato-Soberanis, F.N. Melo-Barrera, P.E. Saucedo. 2011. Use of calcein to estimate and validate age in juveniles of the winged pearl oyster *Pteria sterna*. *Aquat Living Resour.* 24(3):329-335.
- Caipang, C.M., M.F. Brinchmann, V. Kiron. 2010. Antagonistic activity of bacterial isolates from intestinal microbiota of Atlantic cod, *Gadus morhua*, and an investigation of their immunomodulatory capabilities. *Aquac Res.* 41(2):249-256.
- Camara, M. D., J.P. Davis, M. Sekino, D. Hedgecock, G. Li, C.J. Langdon, S. Evans. (2008). The Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* is neither rare nor threatened by hybridization in the northern Ariake Sea, Japan. *J Shellfish Res.* 27(2), 313-322.
- Campa-Córdova, A.I., A. Luna-González, M. Zarain-Herzberg, C.J. Cáceres-Martínez.

2005. Prophylactic use of antibiotics in larval culture of *Argopecten ventricosus* (Sowerby, 1835). *J Shellfish Res.* 24(4):923-930.
- Campa-Córdova, A.I., A. Luna-González, F. Ascencio, E. Cortes-Jacinto, C.J. Caceres-Martinez. 2006. Effects of chloramphenicol, erythromycin, and furazolidone on growth of *Isochrysis galbana* and *Chaetoceros gracilis*. *Aquaculture* 260(1):145-150.
- Campa-Córdova, A.I., H. González-Ocampo, A. Luna-González, J.M. Mazón-Suástegui, F. Ascencio. 2009a. Crecimiento, supervivencia y actividad superóxido dismutasa en juveniles de *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1915) tratados con probióticos. *Hidrobiológica* 19(2):151-157.
- Campa-Córdova, A.I., E.J. Núñez-Vázquez, A. Luna-González, M.J. Romero-Geraldo, F. Ascencio. 2009b. Superoxide dismutase activity in juvenile *Litopenaeus vannamei* and *Nodipecten subnodosus* exposed to the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* 149(3):317-322.
- Campa-Córdova, A., A. Luna-González, J.M. Mazón-Suástegui, G. Aguirre-Guzmán, F. Ascencio, H.A. González-Ocampo. 2011. Efecto de bacterias probióticas en el cultivo larvario del ostión de placer *Crassostrea corteziensis* (Bivalvia: Ostreidae). *Rev Biol Trop.* 59 (1):183-191.
- Castillo, I., C. Lodeiros, M. Nuñez, I. Campos. 2001. Evaluación *in vitro* de sustancias antibacterianas producidas por bacterias aisladas de diferentes organismos marinos. *Rev Biol Trop.* 49(3-4):1213-1222.
- Chin-I, C., L. Wen-Yu, S. Chung-Zen. 2000. Use of prawn blood agar hemolysis to screen for bacteria pathogenic to cultured tiger prawns *Penaeus monodon*. *Dis Aquat Organ.* 43(2):153-157.
- Chiu, C.H., Y.K. Guu, C.H. Liu, T.M. Pan, W. Cheng. 2007. Immune responses and gene expression in white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, induced by *Lactobacillus plantarum*. *Fish Shellfish Immun.* 23(2):364-377.
- Conway, P.L. 2001. Prebiotics and human health: the state-of-the-art and future perspectives. *Food Nutr Res.* 45:13-21.
- Cordero, H., M.A. Esteban, A. Cuesta. 2014. Use of probiotic bacteria against bacterial and viral infections in shellfish and fish aquaculture. En: Hernandez-Vergara, M.P.

- (ed.) Sustainable aquaculture techniques, Murcia, Spain.
- Cowan, S.T., L.J. Steel. 1993. Manual for the Identification of Medical Bacteria. Cambridge University Press. Third edition. Cambridge, UK.
- Daffonchio, D., J. Thaveesri, W. Verstraete. 1995. Contact angle measurement and cell hydrophobicity of granular sludge from upflow anaerobic sludge bed reactors. *Appl Environ Microb.* 61(10):3676-3680.
- Dalmin, G., Kathiresan K., A. Purushothaman. 2001. Effect of probiotics on bacterial population and health status of shrimp in culture pond ecosystem. *Indian J Exp Biol.* 39(9):939-942.
- De la Rosa, G.S., M. Gamboa. 2004. Microorganismos acuáticos: una farmacia por visitar. *Ciencia Ergo Sum.* 11:186-190.
- Díaz, C. 2011. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: influencia de la topografía y composición química de la superficie. Dissertation thesis. Facultad de Ciencias Exactas.
- Dobson, A., P.D. Cotter, R.P. Ross, C. Hill. 2012. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Appl Environ Microbiol.* 78(1):1-6.
- Dosta, M.D.C.M., T.C. Barrera, F.J.F. Perrino, L.M. Reyes. 2009. Revisión bibliográfica: Bacteriocinas producidas por bacterias probióticas. *ContactoS* 73:63-72.
- Duc, L.H., S.M. Cutting. 2003. Bacterial spores as heat stable vaccine vehicles. *Expert Opin Biol Ther.* 3(8):1263-1270.
- Elston, R.A., J. Moore, C.L. Abbott. 2012. Denman Island disease (causative agent *Mikrocytos mackini*) in a new host, Kumamoto oysters *Crassostrea sikamea*. *Dis Aquat Organ.* 102(1):65-71.
- Escobedo-Lozano, A.Y., N. Estrada, F. Ascencio, G. Contreras, R. Alonso-Rodriguez. 2012. Accumulation, biotransformation, histopathology and paralysis in the Pacific Calico Scallop *Argopecten ventricosus* by the paralyzing toxins of the Dinoflagellate *Gymnodinium catenatum*. *Mar drugs.* 10(5):1044-1065.
- Estrada, N., M. de Jesús Romero, A. Campa-Córdova, A. Luna, F. Ascencio. 2007. Effects of the toxic dinoflagellate, *Gymnodinium catenatum* on hydrolytic and antioxidant enzymes, in tissues of the giant lions-paw scallop *Nodipecten*

- subnodosus*. Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol. 146(4):502-510.
- Essa, M.A., S.S. El-Serafy, M.M. El-Ezabi, S.M. Daboor, N.A. Esmael, S.P. Lall. 2010. Effect of different dietary probiotics on growth, feed utilization and digestive enzymes activities of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. J Arabian Aquac Soc. 5(2):143-162.
- FAO. 2006. United Nations Food and Agriculture Organization (FAO), Rome, FAO. 258 p.
- FAO. 2010. The State of World Fisheries and Aquaculture (SOFIA). Rome, FAO. 197 p.
- Fernández, N.T., J.M. Mazón-Suástegui, R. Vázquez-Juárez, F. Ascencio-Valle, J. Romero. 2014. Changes in the composition and diversity of the bacterial microbiota associated with oysters (*Crassostrea corteziensis*, *Crassostrea gigas* and *Crassostrea sikamea*) during commercial production. FEMS Microbiol Ecol. 88(1):69-83.
- Finney, D.J. (ed.) 1971. Probit analysis. Cambridge University Press. Third edition. Cambridge, England. 333 p.
- Flores-Miranda, M.C., A. Luna-González, A.I. Campa-Córdova, J.A. Fierro-Coronado, B.O. Partida-Arangure, J. Pintado, H.A. González-Ocampo. 2012. Isolation and characterization of infectious *Vibrio sinaloensis* strains from the Pacific shrimp *Litopenaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae). Rev Biol Trop. 60:567-576.
- Freites, L., C. Lodeiros, A. Velez, J. Bastardo. 1993. Vibriosis en larvas de la viera tropical *Euvola (pecten) ziczac*. L Carb J Sci. 29:89-98.
- Fujimoto, E.K., N.M. Goetze, B.J. Olson, D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem. 150:76-85.
- Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol. 66(5):365-378.
- Fuller, R. 1992. Problems and Prospects. En: Fuller, R. (ed.) Probiotics: The Scientific Basis. Chapman & Hall. Londres. pp. 377-386.
- Ganesan, A.M., A.C. Alfaro, J.D. Brooks, C.M. Higgins. 2010. The role of bacterial biofilms and exudates on the settlement of mussel (*Perna canaliculus*) larvae. Aquaculture 306(1):388-392.

- García-Bernal, M., A.I. Campa-Córdova, P.E. Saucedo, M. Casanova-González, R. Medina-Marrero, J.M. Mazón-Suástegui. 2015. Isolation and in vitro selection of actinomycetes strains as potential probiotics for aquaculture. *Vet World* 8(2):170-176.
- Gatesoupe, F.J. 1989. Further advances in the nutritional and antibacterial treatments of rotifers as food for turbot larvae, *Scophthalmus maximus* L. En: de Pauw, N. (ed.) *Aquaculture a Biotechnology in Progress*. European Aquaculture Society. Bredene. pp. 721-730.
- Gatesoupe, F.J. 1990. The continuous feeding of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*, and control of the bacterial environment of rotifers. *Aquaculture* 89(2): 139-148.
- Gatesoupe, F.J. 1991a. The effect of three strains of lactic bacteria on the production rate of rotifers, *Brachionus plicatilis*, and their dietary value for larval turbot, *Scophthalmus maximus*. *Aquaculture* 96(3):335-342.
- Gatesoupe, F.J. 1991b. *Bacillus* sp. spores: a new tool against early bacterial infection in turbot larvae. En: Lavens, P., Jaspers, E., Roelands, I. (eds.) *Larvi'91 fish and crustacean larviculture symposium*. European Aquaculture Society. Gent. pp. 409-411.
- Gatesoupe, F.J. 1994. Lactic acid bacteria increase the resistance of turbot larvae, *Scophthalmus maximus* against pathogenic *Vibrio*. *Aquat Living Resour.* 7(4):277-282.
- Gatesoupe, F.J. 1997. Siderophore production and probiotic effect of *Vibrio* sp. associated with turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. *Aquat Living Resour.* 10(4):239-246.
- Gatesoupe, F.J. 1999. The use of probiotic in aquaculture. *Aquaculture* 180(1):147-165.
- Gatesoupe, F.J. 2000. Uso de probióticos en acuicultura. En: Civera-Cerecedo, R., Pérez-Estrada, C.J., Ricque-Marie, D., Cruz-Suárez, L.E. (eds.) *Avances en nutrición acuícola IV. Memorias del IV Simposium Internacional de Nutrición Acuícola*. La Paz, B.C.S., México. pp. 463-472.
- Gatesoupe, F.J. 2002. Probiotic and formaldehyde treatments of *Artemia nauplii* as food for larval pollack, *Pollachius pollachius*. *Aquaculture* 212(1):347-360.

- Gatesoupe, F.J. 2008. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 14(1-3):107-114.
- Genard, B., P. Miner, J.L. Nicolas, D. Moraga, P. Boudry, F. Pernet, R. Tremblay. 2013. Integrative study of physiological changes associated with bacterial infection in Pacific oyster larvae. *PLoS One* 8(5):e64534.
- Genard, B., O. Larouche, J.L. Nicolas, P. Miner, M.L. Beaudin, R. Tremblay. 2014. Effect of the probiotic strain *Phaeobacter gallaeciensis* after bacterial challenge on the complete larval development of *Pecten maximus*. *Aquat Living Resour.* 27(01):27-34.
- Gil-Turnes, C., A.F.D. Santos, F.W.D. Cruz, A.V. Monteiro. 1999. Properties of the *Bacillus cereus* strain used in probiotic CenBiot. *Rev Microbiol.* 30(1):11-14.
- Gómez-Gil, B., A. Roque, J.F. Turnbull. 2000. The use and selection of probiotic bacteria for use in the culture of larval aquatic organisms. *Aquaculture* 191(1):259-270.
- Gómez-Robles, E., J.M. Mazón-Suástegui, H. Acosta-Salmón, M. Hawkyns-Martínez, P.E. Saucedo. 2013. Internal nutrient management associated with gonad quality and successful reproduction in the winged pearl oyster *Pteria sterna*. *Aquaculture* 412:45-51.
- González-Jiménez, A. 2008. Efecto combinando de la temperatura y dieta en el crecimiento, supervivencia y composición bioquímica de semilla de mano de león *Nodipecten subnodosus* (Sowerby). Tesis de Licenciatura, Universidad del Mar, Puerto Ángel, Oaxaca, 81 p.
- González, M., G. Arenas. 2002. Caracterización de la respuesta inmune en el ostión del norte *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819) (Mollusca: Bivalvia). *Cienc Mar.* 28(3):247-255.
- Gram, C. 1884. The differential staining of Schizomycetes in tissue sections and in dried preparations. *Fortschr. Med.* 2:185-9.
- Gram, L., J. Melchiorson, B. Spanggaard, I. Huber, T.F. Nielsen. 1999. Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* AH2, a Possible Probiotic Treatment of Fish. *Appl Environ Microbiol.* 65(3):969-973.

- Granados-Amores, A., A.I. Campa-Córdova, R. Araya, J.M. Mazón-Suástegui, P.E. Saucedo. 2012. Growth, survival and enzyme activity of lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) spat treated with probiotics at the hatchery. *Aquac Res.* 43(9):1335-1343.
- Guerra, C., T. Zenteno-Savín, A.N. Maeda-Martínez, E.E.R. Philipp, D. Abele. 2012b. Changes in oxidative stress parameters in relation to age, growth and reproduction in the short-lived Catarina scallop *Argopecten ventricosus* reared in its natural environment. *Comp Biochem Physiol.* 162(4):421-430.
- Guerra, C., T. Zenteno-Savín, A.N. Maeda-Martínez, D. Abele, E.E.R. Philipp. 2013. The effect of predator exposure and reproduction on oxidative stress parameters in the Catarina scallop *Argopecten ventricosus*. *Comp Biochem Phys A.* 165(1):89-96.
- Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. En: Smith, W.L., Chanley, M.H. (eds.) *Culture of marine invertebrate animals*. Plenum Press, New York. pp. 26-60.
- Guillot, J.F. 2000. The pros and cons of probiotics: Make probiotics work for poultry. *World Poultry* 16:18-21.
- Gupta, R., N. Gupta, P. Raith. 2004. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol.* 64(6):763-781.
- Hadfield, M.G. 2011. Biofilms and marine invertebrate larvae: what bacteria produce that larvae use to choose settlement sites. *Ann Rev Mar Sci.* 3:453-470.
- Hamaguchi, M., H. Shimabukuro, M. Kawane, T. Hamaguchi. 2013. A new record of the Kumamoto oyster *Crassostrea sikamea* in the Seto In land Sea, Japan. *Mar Biodivers. Rec.* 6:e16.
- Hansen, G.H., J.A. Olafsen. 1999. Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. *Microb. Ecol.* 38(1):1-26.
- Hassan, A.N., J.F. Frank, S.I. Shalabi. 2001. Factors affecting capsule size and production by lactic acid bacteria used as dairy starter cultures. *Int J Food Microbiol.* 64(1):199-203.
- Hawkyns-Martínez, M., P.E. Saucedo, L. Carreón-Palau, E. Gómez-Robles, H. Acosta-Salmón. 2014. Accumulation of docosapolyenoic fatty acids in developing oocytes

of the winged pearl oyster *Pteria sterna*. *Aquaculture* 432:74-79.

- Helm, M.M., N. Bourne, A. Lovatelli. (eds.) *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico*. FAO Documento Técnico de Pesca, no. 471. Roma, FAO. 184 p.
- Hinsa, S.M., M. Espinosa Urgel, J.L. Ramos, G.A. O'Toole. 2003. Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol.* 49(4):905-918.
- Hoa, N.T., L. Baccigalupi, A. Huxham, A. Smertenko, P.H. Van, S. Ammendola, R. Ezio, S.M. Cutting. 2000. Characterization of *Bacillus* species used for oral bacteriotherapy and bacterioprophyllaxis of gastrointestinal disorders. *Appl Environ Microb.* 66(12):5241-5247.
- Holzappel, W.H.P., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger, J.H.J. Huis in't Veld. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int J Food Microbiol.* 41(2):85-101.
- Hong, H.A., L.H. Duc, S.M. Cutting. 2005. The use of bacterial spore formers as probiotics. *FEMS Microbiol Rev.* 29(4):813-835.
- Iehata, S., T. Inagaki, S. Okunishi, M. Nakano, R. Tanaka, H. Maeda. 2010. Improved gut environment of abalone *Haliotis gigantea* through *Pediococcus* sp. Ab1 treatment. *Aquaculture* 305(1):59-65.
- Irianto, A., B. Austin. 2002. Probiotics in aquaculture. *J Fish Dis.* 25(11):633-642.
- Itoi, S., J. Uchida, S. Takanashi, T. Narita, K. Abe, S. Naya, H. Sugita. 2014. The clam *Meretrix lamarckii* (Bivalvia: Veneridae) is a rich repository of marine lactic acid bacterial strains. *Ann Microbiol.* 64(3):1267-1274.
- Jacobs, A., H.Y. Chenia. 2011. Biofilm formation and adherence characteristics of an *Elizabethkingia meningoseptica* isolate from *Oreochromis mossambicus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 10:16-16.
- Jatobá, A., F. do Nascimento Vieira, C.C. Buglione-Neto, J.L.P. Mourino, B.C. Silva, W.Q. Seiffter, E.R. Andreatta. 2011. Diet supplemented with probiotic for Nile tilapia in polyculture system with marine shrimp. *Fish Physiol Biochem.* 37(4):725-732.
- Kapareiko, D., H.J. Lim, E.J. Schott, A. Hanif, G.H. Wikfors. 2011. Isolation and Evaluation of New Probiotic Bacteria for use in Shellfish Hatcheries: II. Effects of

- a *Vibrio* sp. probiotic candidate upon survival of oyster larvae (*Crassostrea virginica*) in Pilot-Scale Trials. J Shellfish Res. 30(3):617-625.
- Karim, M., W. Zhao, D. Rowley, D. Nelson, M. Gomez-Chiarri. 2013. Probiotic strains for shellfish aquaculture: Protection of Eastern oyster, *Crassostrea virginica*, larvae and juveniles against bacterial challenge. J Shellfish Res. 32(2):401-408.
- Keen, M.A. 1971. Sea Shells of Tropical West America. Marine Mollusks from Baja California to Peru. Stanford University Press. California. 1065 p.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan, L. Gibson. 2008. Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture 274(1):1-14.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan, L. Gibson. 2009. Screening for probiotics of Greenshell™ mussel larvae, *Perna canaliculus*, using a larval challenge bioassay. Aquaculture, 296(1):159-164.
- Kesarcodi-Watson, A., P. Miner, J.L. Nicolas, R. Robert. 2012a. Protective effect of four potential probiotics against pathogen-challenge of the larvae of three bivalves: Pacific oyster (*Crassostrea gigas*), flat oyster (*Ostrea edulis*) and scallop (*Pecten maximus*). Aquaculture 344:29-34.
- Kesarcodi-Watson, A., H. Kaspar, M.J. Lategan, L. Gibson. 2012b. Performance of single and multi-strain probiotic during hatchery production of Greenshell (TM) mussel larvae, *Perna canaliculus*. Aquaculture 354:56-63.
- Kesarcodi-Watson, A., P. Miner, J.L. Nicolas, K. Asmani, R. Robert. 2014. Pathogenic threats and probiotic use in larviculture of the scallop, *Pecten maximus*. Aquac Res. DOI: 10.1111/are.12579.
- Kim, K., J. Seo, K. Wheeler, C. Park, D. Kim, S. Park, K. Wonyong, T. Leighton. 2005. Rapid genotypic detection of *Bacillus anthracis* and the *Bacillus cereus* group by multiplex real-time PCR melting curve analysis. Fems Immunol Med Mic. 43(2):301-310.
- Kivanc, M., M. Yilmaz, E. Çakir. 2011. Isolation and identification of lactic acid bacteria from boza, and their microbial activity against several reporter strains. Turkish J Biol. 35(3):313-324.
- Koneman, E.W., S.D. Allen, W.M. Janda, P.C. Schreckenberger, W.C. Winn. 2001.

- Diagnóstico Microbiológico. Médica Panamericana. Mexico. 533 p.
- Kongnum, K., T. Hongpattarakere. 2012. Effects of *Lactobacillus plantarum* isolated from digestive tract of wild shrimp on growth and survival of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) challenged with *Vibrio harveyi*. Fish Shellfish Immunol. 32(1):170-177.
- Kozasa, M. 1986. Toyocerin (*Bacillus toyoi*) as growth promotor for animal feeding. Microbiologie Aliments Nutrition. 4:121-135.
- Kumar, R., S.C. Mukherjee, K.P. Prasad, A.K. Pal. 2006. Evaluation of *Bacillus subtilis* as a probiotic to Indian major carp *Labeo rohita* (Ham.). Aquac Res. 37(12):1215-1221.
- Kumar, R.S., P. Kanmani, N. Yuvaraj, K.A. Paari, V. Pattukumar, C. Thirunavukkarasu, V. Arul. 2012. *Lactobacillus plantarum* AS1 isolated from south Indian fermented food Kallappam suppress 1, 2-dimethyl hydrazine (DMH)-induced colorectal cancer in male Wistar rats. Appl Biochem Biotech. 166(3):620-631.
- Laloo, R., S. Ramchuran, D. Ramduth, J. Görgens, N. Gardiner. 2007. Isolation and selection of *Bacillus* spp. as potential biological agents for enhancement of water quality in culture of ornamental fish. J Appl Microbiol. 103(5):1471-1479.
- Lambert, C. 1998. Etude des infections Vibrionaceae chez les mollusques bivalves, a partir d'un modele larves de *Pecten maximus*. Tesis de Doctorado. de L'Universite de Bretagne Occidentale. France. 182 p.
- Lara-Flores, M. 2011. The use of probiotic in aquaculture: an overview. Int Res J Microbiol. 2(12):471-478.
- Lebeer, S., J. Vanderleyden, S.C. De Keersmaecker. 2008. Genes and molecules of *Lactobacilli* supporting probiotic action. Microbiol. Mol Biol Rev. 72:728-764.
- Le Bris, C., G. Richard, C. Paillard, C. Lambert, C. Seguineau, O. Gauthier, F. Pernet, F. Guérard. 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*—Part I: Spatio-temporal evolution of enzymes' activities post-infection. Fish Shellfish Immun. 42(1):16-24.
- Lee, R., A. Lovatelli, L. Ababouch. 2010a. Depuración de bivalvos. Aspectos fundamentales y prácticos. FAO. Roma. 153 p.

- Lee, H.I., M.H. Kim, K.Y. Kim, J.S. So. 2010b. Screening and selection of stress resistant *Lactobacillus* spp. isolated from the marine oyster (*Crassostrea gigas*). *Anaerobe* 16(5):522-526.
- León, J., L. Liza, I. Soto, M. Torres, A. Orosco. 2010. Bacterias marinas productoras de compuestos antibacterianos aisladas a partir de invertebrados intermareales. *Rev Perú Med Exp Salud Publica* 27:215-221.
- Leyton, Y., C. Riquelme. 2008. Vibrios en los sistemas marinos costeros. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 43:441-456.
- Leyton, Y.E., R.A. Varas-Psijas, C.E. Riquelme. 2012. Probiotic activity of bacteria associated with egg capsules of *Concholepas concholepas* (common name 'Loco'). *Aqua Res.* 43(8):1089-1095.
- Li, J., Y. Xu, L. Jin, X. Li. 2014. Effects of a probiotic mixture (*Bacillus subtilis* YB-1 and *Bacillus cereus* YB-2) on disease resistance and non-specific immunity of sea cucumber, *Apostichopus japonicus* (Selenka). *Aquac Res.* DOI: 10.1111/are.12453.
- Lilly, D.M., R.H. Stillwell. 1965. Probiotics growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147:747-748.
- Lim, H.J., D. Kapareiko, E.J. Schott, A. Hanif, G.H. Wikfors. 2011. Isolation and evaluation of new probiotic bacteria for use in shellfish hatcheries: I. Isolation and screening for bioactivity. *J Shellfish Res.* 30(3):609-615.
- Lodeiros, C.J., J. Bolinches, C.P. Dopazo, A. Toranzo. 1987. Bacillar necrosis in hatcheries of *Ostrea edulis* in Spain. *Aquaculture* 65(1):19-25.
- Lodeiros, C.J., E. Fernández, A. Vélez, J. Bastardo. 1988. Producción de antibióticos por bacterias marinas y su utilización en la acuicultura. *Bol Inst Oceanogr Venezuela Univ Oriente* 27(1):63-69.
- Luis-Villaseñor, I.E., M.E. Macías-Rodríguez, B. Gómez-Gil, F. Ascencio-Valle, A.I. Campa-Córdova. 2011. Beneficial effects of four *Bacillus* strains on the larval cultivation of *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture* 321(1):136-144.
- Luis-Villaseñor, I. E., A.I. Campa-Córdova, N. Huerta-Aldaz, A. Luna-González, J.M. Mazón-Suástegui, F. Flores-Higuera. 2013. Effect of beneficial bacteria on larval

- culture of Pacific whiteleg shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Afr J Microbiol Res. 7(27):3471-3478.
- Luna-González, A., A. Maeda-Martínez, F. Ascencio-Valle. 2002. Comparative susceptibility of veliger larvae of four bivalve mollusks to a *Vibrio alginolyticus* strain. Dis Aquat Organ. 49(3):221-226.
- Luna-González, A., A.N. Maeda-Martínez, F. Vargas-Albores, F. Ascencio-Valle, M. Robles-Mungaray. 2003. Phenoloxidase activity in larval and juvenile homogenates and adult plasma and haemocytes of bivalve molluscs. Fish Shellfish Immun. 15(4):275-282.
- Luna-González, R.E.M.A., M. del Carmen Flores-Miranda, P.A.R.J.A. Fierro, C.A.C. Sánchez-Ortiz, J. Ávila-Leal. 2015. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria suitable for mollusk larvae cultures. Thai J Vet Med. 45(1):11-21.
- Macey, B.M., V.E. Coyne. 2005. Improved growth rate and disease resistance in farmed *Halotis midae* through probiotic treatment. Aquaculture 245(1):249-261.
- MacFaddin, J.F. (ed.) 2003. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Médica Panamericana. Buenos Aires. 850 p.
- Maeda, M. 1994. Biocontrol of the larval rearing biotope in aquaculture. Bull Nat Res Inst Aquaculture 1:71-74.
- Maeda-Martínez, A.N. (ed.) 2002. Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y Acuicultura. Limusa. México. 501 p.
- Maeda-Martínez, A.N. 2008. Estado actual del cultivo de bivalvos en México. En: Lovatelli, A. Farías, A., Uriarte, I. (eds.) Estado actual de cultivo y manejo de moluscos bivalvos y su proyección futura: factores que afectan su sustentabilidad en América Latina. Actas de pesca y acuicultura, no. 12. Roma, FAO. pp 91-100.
- Mahdhi, A., B. Harbi, M.Á. Esteban, K. Chaieb, F. Kamoun, A. Bakhrouf. 2010. Using mixture design to construct consortia of potential probiotic *Bacillus* strains to protect gnotobiotic *Artemia* against pathogenic *Vibrio*. Biocontrol Sci Techn. 20(9):983-996.

- Martinez, M.J., J. Betancourt, N. Alonso-González, A. Jauregui. 1996. Screening of some Cuban medicinal plants for antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol.* 52(3):171-174.
- Marty, P., Y. Martin. 1992. Bactéries hétérotrophes aérobies isolées d'invertébrés benthiques des eaux côtières méditerranéennes: caractéristiques des souches, production d'exoenzymes et d'agents antibactériens. *Marine Life* 1(1):1-8.
- Mathur, S., R. Singh. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int J Food Microbiol.* 105(3):281-295.
- Mattos-Guaraldi, A.L., L.C. Formiga, A.F. Andrade. 1999. Cell surface hydrophobicity of sucrose fermenting and nonfermenting *Corynebacterium diphtheriae* strains evaluated by different methods. *Current Microbiology* 38(1):37-42.
- Matsuda, H., T. Wang, H. Managi, M. Yoshikawa. 2003. Structural requirements of flavonoids for inhibition of protein glycation and radical scavenging activities. *Bioorg Med Chem.* 11(24):5317-5323.
- Mayrhofer, S., K.J. Domig, C. Mair, U. Zitz, G. Huys, W. Kneifel. 2008. Comparison of broth microdilution, Etest, and agar disk diffusion methods for antimicrobial susceptibility testing of *Lactobacillus acidophilus* group members. *Appl Environ Microb.* 74(12):3745-3748.
- Mazón-Suástegui, J.M. 2005. Biología y cultivo de la almeja Catarina *Argopecten ventricosus* (Sowerby II, 1842). Dissertation thesis, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.
- Mazón-Suástegui, J.M., K.M. Ruiz-Ruiz, A. Parres-Haro, P. Saucedo. 2008. Combined effects of diet and stocking density on growth and biochemical composition of spat of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* at the hatchery. *Aquaculture* 284: 98–105.
- Mazón-Suástegui, J.M, A. Parres-Haro, K.M. Ruiz-Ruiz, C. Rodríguez-Jaramillo, P. Saucedo. 2009. Influence of hatchery diets on early grow-out of the Cortez oyster *Crassostrea corteziensis* in Sinaloa, Mexico. *Aquac Res.* 40:1908-1914.
- Mazón-Suástegui, J.M., A.N. Maeda-Martínez, M. Robles-Mungaray, J.P. De La Roche, G.S. Rupp, M.M. De Bem, L.A. Velasco, L.F. Freites-Valbuena. 2011. Avances en la producción de juveniles de *Nodipecten* spp. En: Maeda-Martínez,

- A.N., Lodeiros, C. (eds.) *Biología y Cultivo de los Moluscos Pectínidos del Género Nodipecten*. Limusa. México. pp 275-311.
- McFarland, L.V. 2006. Meta-analysis of probiotics for the prevention of antibiotic associated diarrhea and the treatment of *Clostridium difficile* disease. *Am J Gastroenterol*. 101(4):812-822.
- Méndez-Ortiz, M.M., J. Membrillo-Hernández. 2004. Mecanismos moleculares de la síntesis de celulosa en bacterias. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas* 7(1): 26-34.
- Miranda, C.D., R. Rojas, A. Abarca, L. Hurtado. 2013. Effect of florfenicol and oxytetracycline treatments on the intensive larval culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquac Res*. 45(1):16-30.
- Monteforte, M. 1996. Cultivo de Ostras Perleras y Pericultura. En: Ponce, G., Casas, M. (eds.) *Diagnóstico Pesquero y Acuicola del Estado de Baja California Sur. Convenio interinstitucional CIBNOR/CICIMAR/UABCS/CETMAR/SEMARNAP/FAO. Volumen II*. pp. 571-613.
- Moriarty, D.J.W. 1997. The role of microorganisms in aquaculture ponds. *Aquaculture* 151(1):333-349.
- Moriarty, D.J.W. 1998. Control of luminous *Vibrio* species in penaeid aquaculture ponds. *Aquaculture* 164(1):351-358.
- Mourad, K. 2007. Plasmid DNA studies in *Lactobacillus plantarum* strains isolated from olive fermentations: production of and immunity to plantaricin OL15 is associated to a 9.6 Kb plasmid (pOL15). *Grasas Aceites* 58(2):136-141.
- Mozes, N., P.G. Rouxhet. 1987. Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. *J Microbiol Methods*. 6(2):99-112.
- Muñoz-Atienza, E., B. Gómez-Sala, C. Araújo, C. Campanero, R. Del Campo, P.E. Hernández, L.M. Cintas. 2013. Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC Microbiol*. 13-15:1-22.
- Nadell, C.D., J.B. Xavier, K.R. Foster. 2009. The sociobiology of biofilms. *Fems Microbiol Rev*. 33(1):206-224.

- Nakano, H. 2007. Kumamoto oyster no ohanashi (What's a Kumamoto oyster?). Kumamoto Suiken Center News 15:9. [En Japonés].
- Nemutanzhela, M.E., Y. Roets, N. Gardiner, R. Laloo. 2014. The use and benefits of *Bacillus* based biological agents in aquaculture. En: Hernandez-Vergara, M. (ed.) Sustainable aquaculture techniques. Murcia, Spain.
- Newaj-Fyzul, A., A.H. Al-Harbi, B. Austin. 2014. Review: Developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture 431:1-11.
- Nimrat, S., T. Boonthai, V. Vuthiphandchai. 2011. Effects of probiotic forms, compositions of and mode of probiotic administration on rearing of Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) larvae and postlarvae. Anim Feed Sci Technol. 169(3):244-258.
- Nimrat, S., S. Suksawat, T. Boonthai, V. Vuthiphandchai. 2012. Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Vet Microbiol. 159(3):443-450.
- Nithya, V., P.M. Halami. 2013. Evaluation of the probiotic characteristics of *Bacillus* species isolated from different food sources. Ann Microbiol. 63(1):129-137.
- Nogami, K., M. Maeda. 1992. Bacteria as biocontrol agents for rearing larvae of the crab *Portunus tribeculatus*. Can J Fish Aquat Sci. 49(11):2373-2376.
- O'Brien, T.F. 2002. Emergence, spread, and environmental effect of antimicrobial resistance: How use of an antimicrobial anywhere can increase resistance to any antimicrobial anywhere else. Clin Infect Dis. 34(3):578-584.
- Osuna-García, M., A. Hernandez-Llamas, J.M. Mazón-Suástegui. 2008. Production dynamics of the giant lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* cultivated off-bottom. Aquaculture 274(2):260-267.
- O'Toole, P.W., J.C. Cooney. 2008. Probiotic bacteria influence the composition and function of the intestinal microbiota. Interdiscip Perspect Infect Dis. Doi: 10.1155/2008/175285
- Ouwehand, A.C., P.V. Kirjavainen, C. Shortt, S. Salminen. 1999. Probiotics: Mechanisms and established effects. Int Dairy J. 9(1):43-52.
- Ouwehand, A.C., S. Salminen. 2003. In vitro adhesion assays for probiotics and their

- in vivo relevance: a review. *Microb Ecol Health D.* 15(4):175-184.
- Paillard, C., F. Le Roux, J.J. Borrego. 2004. Bacterial disease in marine bivalves, a review of recent studies: trends and evolution. *Aquat Living Resour.* 17(4):477-498.
- Pandiyan, P.,D. Balaraman, R. Thirunavukkarasu, E.G.J. George, K. Subaramaniyan, S. Manikkam, B. Sadayappan. 2013. Probiotics in aquaculture. *Drug Invent Today* 5(1):55-59.
- Park, S.J., S.O. Yoo. 2000. Effects of supplementation of antibiotic, probiotic and yeast culture on performance and meat quality in broiler chicks. *Korean J Poult Sci.* 27:203-208.
- Park, Y.H., S.Y. Hwang, M.K. Hong, K.H. Kwon. 2012. Use of antimicrobial agents in aquaculture. *Rev Sci Tech OIE.* 31:189-197.
- Parker, R.B. 1974. Probiotics. The other half of the antibiotics story. *Anim Nutr Health.* 29:4-8.
- Pasteris, S.E., E.V. Pingitore, G.R. Babot, M.C. Otero, M.I. Bühler, M.E. Nader-Macías. 2009. Characterization of the beneficial properties of lactobacilli isolated from bullfrog (*Rana catesbeiana*) hatchery. *Antonie Van Leeuwenhoek* 95(4):373-385.
- Pellón, F., R. Orozco, J. León. 2001. Bacterias marinas con capacidad antimicrobiana aisladas de moluscos bivalvos en cultivos. *Rev Peru Biol.* 8:73-81.
- Peña, B.J. 2001. Taxonomía, morfología distribución y hábitat de los pectínidos Iberoamericanos. En: Maeda-Martínez A.N. (ed.) *Los Moluscos pectínidos de Iberoamérica: ciencia y Acuicultura.* Limusa. México. pp. 1-25.
- Planas, M., J.A., Vázquez, J. Marqués, R. Pérez-Lomba, M.P. González, M. Murado. 2004. Enhancement of rotifer (*Brachionus plicatilis*) growth by using terrestrial lactic acid bacteria. *Aquaculture* 240(1):313-329.
- Plante, S., F. Pernet, R. Haché, R. Ritchie, B. Ji, D. McIntosh. 2007. Ontogenetic variations in lipid class and fatty acid composition of haddock larvae *Melanogrammus aeglefinus* in relation to changes in diet and microbial environment. *Aquaculture* 263(1):107-121.
- Prado, S., J.L. Romalde, J.L. Barja. 2010. Review of probiotics for use un bivalve hatcheries. *Vet Microbiol.* 145(3):187-197.

- Presscott, H. 2002. Laboratory Exercises in Microbiology. The McGraw-Hill Companies. Fifth edition. 46 p.
- Prieur, G., J.L. Nicolas, A. Plusquellec, M. Vigneulle.1990. Interactions between bivalves mollusks and bacteria in the marine environment. *Oceanogr Mar Biol Annu. Rev.* 28:227-352.
- Priest, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the genus *Bacillus*. *Bacteriol Rev.* 41(3):711.
- Ramírez, L.S., H.E. Díaz. 2007. Actividad antibacteriana de extractos y fracciones del ruibarbo (*Rumex conglomeratus*). *Sci Tech.* 1(33).
- Ramírez-Castillo, R.E., M. Arellano-Martínez, B.P. Ceballos-Vázquez, H.A. González-Ocampo, A. Luna-González. 2011. Immune response of the Lion's paw scallop *Nodipecten subnodosus* (Sowerby, 1835) challenged with *Vibrio alginolyticus*. *Thai J Vet Med.* 41(4):425-432.
- Reid, G., P.L. Cuperus, A.W. Bruce, H.C. Van der Mei, L. Tomczek, A.H. Khoury, H.J. Busscher. 1992. Comparison of contact angles and adhesion to hexadecane of urogenital, dairy, and poultry lactobacilli: effect of serial culture passages. *Appl Environ Microb.* 58(5):1549-1553.
- Reid, R.T., D.H. Live, D.J. Faulkner, A. Butler. 1993. A siderophore from a marine bacterium with an exceptional ferric ion affinity constant. *Nature* 366:455-458.
- Ren, L., Y. Hemar, C.O. Perera, G. Lewis, G.W. Krissansen, P.K. Buchanan. 2014. Antibacterial and antioxidant activities of aqueous extracts of eight edible mushrooms. *Bioactive Carbohydrates Dietary Fibre* 3(2):41-51.
- Richard, G., C. Le Bris, F. Guérard, C. Lambert, C. Paillard. 2015. Immune responses of phenoloxidase and superoxide dismutase in the manila clam *Venerupis philippinarum* challenged with *Vibrio tapetis*—Part II: Combined effect of temperature and two *V. tapetis* strains. *Fish Shellfish Immunol.* 44(1):79-87.
- Riquelme, C., G. Hayashida, R. Araya, A. Uchida, M. Satomi, Y. Ishida. 1996. Isolation of a native bacterial strain from the scallop *Argopecten purpuratus* with inhibitory effects against pathogenic Vibrios. *J Shellfish Res.* 15:369-374.

- Riquelme, C., R. Araya, N. Vergara, A. Rojas, M. Guaita, M. Candia. 1997. Potencial probiotic strains in culture of the Chilean scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 154(1):17-26.
- Riquelme, C.E., M.A. Jorquera, A.I. Rojas, R.E. Avendaño, N. Reyes. 2001. Addition of inhibitor-producing bacteria to mass cultures of *Argopecten purpuratus* larvae (Lamarck, 1819). *Aquaculture* 192(2):111-119.
- Robert, R., P. Miner, J.L. Nicolas. 1996. Mortality control of scallop larvae in the hatchery. *Aquacult Int.* 4(4):305-313.
- Robles-Mungaray, M., S.J. Serrano-Guzmán. 1995. Larval growth, survival and spot production of *Argopecten circularis* (Sowerby, 1835) in a Mexican commercial hatchery. *Riv Italiana Acquacoltura* 30:187-193.
- Roch, P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture* 172(1):125-145.
- Roe, J.H., J.M. Bailey, R.R. Gray, J.N. Robinson. 1961. Complete removal of glycogen from tissues by extraction with cold trichloroacetic acid solution. *J Biol Chem.* 236(5):1244-1246.
- Rojas, J.J., V.J. Ochoa, S.A. Ocampo, J.F. Muñoz. 2006. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: A possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. *BMC Complement Altern Med.* 6(1):2.
- Rojas, R., C.D. Miranda, R. Opazo, J. Romero. 2015. Characterization and pathogenicity of *Vibrio splendidus* strains associated with massive mortalities of commercial hatchery-reared larvae of scallop *Argopecten purpuratus* (Lamarck, 1819). *J Invertebr Pathol.* 124:61-69.
- Romero, J., C.G. Feijóo, P. Navarrete. 2012. Antibiotics in aquaculture-use, abuse and alternatives. En: Carvalho, E.D., Silva David, G., da Silva, R.J. (eds.) *Health and Environment in Aquaculture*. Tech Europe. Rajeka, Croatia. pp. 159-198.
- Rosenberg, M. 1984. Bacterial adherence to hydrocarbons: a useful technique for studying cell surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol Lett.* 22(3):289-295.
- Rosenberg, M., S. Kjelleberg. 1986. Hydrophobic interactions: role on bacterial adhesion. *Microbial Ecol.* 9:353-393.

- Rosenfeld, W.D., C.E. ZoBell. 1947. Antibiotic production by marine microorganisms. *J Bacteriol.* 54(3):393.
- Sainz-Hernández, J.C., A.N. Maeda-Martínez, F. Ascencio. 1998. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the Catarina scallop (*Argopecten ventricosus* = *circularis*) (Sowerby II, 1842). *Microb Ecol.* 35(2):188-192.
- Sainz-Hernández, J.C., A.N. Maeda-Martínez, F. Ascencio. 1999. Experimental vibriosis induction with *Vibrio alginolyticus* of larvae of the catarina scallop (*Argopecten ventricosus circularis*) (Sowerby II, 1842). *Microb Ecol.* 35(2):188-192.
- Sainz-Hernández, J.C., A.N. Maeda-Martínez. 2005. Sources of *Vibrio* bacteria in mollusc hatcheries and control methods: a case study. *Aquac Res.* 36(16):1611-1618.
- Saitou, N., M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4(4):406-425.
- Salinas, I., A. Cuesta, M.A. Esteban, J. Meseguer. 2005. Dietary administration of *Lactobacillus delbrueckii* and *Bacillus subtilis*, single or combined, on gilthead seabream cellular innate immune responses. *Fish Shellfish Immun.* 19(1): 67-77.
- Sánchez-Ortiz, A.C., A. Luna-González, A.I. Campa-Córdova, R. Escamilla-Montes, M. del Carmen Flores-Miranda, J.M. Mazón-Suástegui. Isolation and characterization of potential probiotic bacteria from pustulose ark (*Anadara tuberculosa*) suitable for shrimp farming. *Lat Am J Aquat Res*, 43(1), 123-136.
- Saucedo, P.E., P. Ormart-Castro, M. Osuna-García. 2007. Towards development of large-scale hatchery cultivation of larvae and spat of the pearl oyster *Pinctada mazatlanica* in Mexico. *Aquaculture* 273: 478-486.
- Saucedo, P.E., A. González-Jiménez, H. Acosta-Salmón, J.M. Mazón-Suástegui, J.A. Ronsón-Paulín. 2013. Nutritional value of microalgae-based diets for lions-paw scallop (*Nodipecten subnodosus*) juveniles reared at different temperatures. *Aquaculture* 392:113-119.
- Serna-Gallo, I., J.M. Ruiz-Velazco, H. Acosta-Salmon, E. Peña-Messina, G. Torres-Zepeda, P.E. Saucedo. 2014. Growth and reproduction patterns of the winged

- pearl oyster, *Pteria sterna*, cultivated in tropical environments of Mexico: Implications for pearl farming. *Cienc Mar.* 40(2):75-88.
- Setyati, W.A. 2015. Selection, identification and optimization of the growth water probiotic consortium of mangrove ecosystems as bioremediation and biocontrol in shrimp ponds. *JPHPI.* 17(3):242-252.
- Sharma, K.K., S.S. Soni, S. Meharchandani. 2006. Congo red dye agar test as an indicator test for detection of invasive bovine *Escherichia coli*. *Veterinarski arhiv.* 76(4):363-366.
- Shimizu, N., K. Kobayashi, K. Hayashi. 1984. The reaction of superoxide radical with catalase. Mechanism of the inhibition of catalase by superoxide radical. *J. Biol. Chem.* 259(7): 4414-4418.
- Shu-hong, W., W. Yi-lei, Z. Zhao-xia, W. Chao-hong, Z. Zhi-hua, Z. Zi-ping. 2004. Response of innate immune factors in abalone *Haliotis diversicolor supertexta* to pathogenic or nonpathogenic infection. *J Shellfish Res.* 23:1173-1177.
- Sica, G.M., N.L. Olivera, L.I. Brugnoli, P.L. Marucci, C. López, M.A. Cubitto. 2010. Isolation, identification and antimicrobial activity of lactic acid bacteria from the Bahía Blanca. *Rev Biol Mar Oceanogr.* 45(3):389-397.
- Singh, V.P., J. Sharma, S. Babu, S.A. Rizwanulla, A. Singla. 2013. Role of probiotics in health and disease: a review. *J Pak Med Assoc.* 63(2):253-257.
- Sonenshein, A.L. 2000. Endospore-forming bacteria: an overview. *Prokaryotic development.* American Society for Microbiology, Washington, DC, 133-150.
- Song, L., L. Wang, L. Qiu, H. Zhang. 2010. Bivalve Immunity. En: Söderhäll, K. (ed.) *Invertebrate Immunity.* Springer Science & Business Media, New York. pp. 44-65.
- Soria, G., M.F. Lavín, I. Martínez-Tovar, A. Macías-Duarte. 2013. Recruitment of Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) larvae on artificial collectors off the NE coast of the Gulf of California. *Aquac Res.* 44(9):1383-1398.
- Sou, T. 2008. Shikame-gaki youshoku eno trikumi-Kumamoto oyster no fukkatsu (Aquaculture trials of Kumamoto oyster in Kumamoto, Japan—the wise uses of native Kumamoto oyster.). *Kumamoto Suiken Center News* 16:3. [En Japonés].
- Spiers, A.J., J. Bohannon, S.M. Gehrig, P.B. Rainey. 2003. Biofilm formation at the air-

- liquid interface by the *Pseudomonas fluorescens* SBW25 wrinkly spreader requires an acetylated form of cellulose. *Mol Microbiol.* 50(1):15-27.
- Steel, K.J. 1961. The oxidase reaction as a taxonomic tool. *J. Gen. Microbiol.* 25(2): 297-306.
- Subhash, S.K., A.P. Lipton. 2007. Effects of a probiotic bacterium, *Lactobacillus acidophilus*, on the growth and survival of pearl oyster (*Pinctada margaritifera*) spat. *Israeli J Aqua-Bamidgeh* 59:201-205.
- Sugita, H., J. Takahashi, Y. Deguchi. 1992. Production and consumption of biotin by the intestinal microflora of cultured freshwater fishes. *Biosci Biotechnol Biochem.* 56(10):1678-1679.
- Sugita, H., N. Matsuo, Y. Hirose, M. Iwato, Y. Deguchi. 1997. *Vibrio* sp. strain NM10, isolated from the intestine of a Japanese coastal fish, has an inhibitory effect against *Pasteurella piscida*. *Appl Environ Microbiol.* 63:4986–4989.
- Sugumar, G., T. Nakai, Y. Hirata, D. Matsubara, K. Muroga. 1998. *Vibrio splendidus* biovar II as the causative agent of bacillary necrosis of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Dis Aquat Org.* 33:111-118.
- Sullivan, D.J.O. 2001. Screening of intestinal microflora for effective probiotic bacteria. *J Agric Food Chem.* 49(4):1751-1760.
- Suzer, C., D. Çoban, H.O. Kamaci, Ş. Saka, K. Firat, Ö. Otgucuoğlu, H. Küçüksari. 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280(1):140-145.
- Takahashi, K.G., A. Nakamura, K. Mori. 2000. Inhibitory effects of ovoglobulins on bacillary necrosis in larvae of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *J Invertebr Pathol.* 75(3):212-217.
- Talpur, A.D., A.J. Memon, M.I. Khan, M. Ikhwanuddin, M.D. Daniel, A.B. Abol-Munafi. 2012. Effects of *Lactobacillus* probiotics on the enhancement of larval survival of *Portunus pelagicus* (Linnaeus, 175) fed via bioencapsulated in live feed. *World* 4(1):42-49.
- Tambekar, D.H., V.R. Dhundale. 2012. Studies on the physiological and cultural diversity of *Bacilli* characterized from Lonar Lake (MS) India. *Bioscience*

Discovery. 3:34-39.

Tamayo, C., J.C. Mullo, F. Burgos. 2011. Análisis comparativo de los halos de inhibición de dos probióticos comerciales en *Vibrio vulnificus*, *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus*.

<http://www.dspace.espol.edu.ec/handle/123456789/17115>

Tamura, K., M. Nei, S. Kumar. 2004. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 101:11030-11035.

Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* 28(10):2731-2739.

Thakur, A.B., R.B. Vaidya, S.A. Suryawanshi. 2003. Pathogenicity and antibiotic susceptibility of *Vibrio* species isolated from moribund shrimps. *Indian J Mar Sci.* 32(1):71-75.

Touraki, M., G. Karamanlidou, P. Karavida, K. Chrysi. 2012. Evaluation of the probiotics *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum* bioencapsulated in *Artemia nauplii* against vibriosis in European sea bass larvae (*Dicentrarchus labrax*, L.). *World J Microb Biot.* 28(6):2425-2433.

Tovar, D., J. Zambonino, C. Cahu, F.J. Gatesoupe, R. Vázquez-Juárez, R. Lésel. 2002. Effect of live yeast incorporation in compound diet on digestive enzyme activity in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. *Aquaculture* 204(1):113-123.

Travers, R.S., P.A. Martin, C.F. Reichelderfer. 1987. Selective process for efficient isolation of soil *Bacillus* spp. *Appl. Environ. Microb.* 53(6):1263-1266.

Tubiash, H.S., P.E. Chandley, E. Leifson. 1965. Bacillary necrosis, a disease of larval and juvenile bivalve mollusks. *J Bacteriology* 90(4):1036-1044.

Uriarte, I., G. Rupp, A. Abarca. 2001. Producción de juveniles de pectínidos Iberoamericanos bajo condiciones controladas. En: Maeda-Martínez A.N. (ed) *Los moluscos pectínidos de Iberoamérica: Ciencia y acuicultura*. Limusa. México. pp 147-171.

Van Loosdrecht, M.C., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, A.J. Zehnder. 1987a. Electrophoretic mobility and hydrophobicity as a measured to predict the initial

- steps of bacterial adhesion. *Appl Environ Microb.* 53(8):1898-1901.
- Van Loosdrecht, M.C., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa, A.J. Zehnder. 1987b. The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl Environ Microb.* 53(8):1893-1897.
- Vargas-Albores, F., M.A. Barracco. 2001. Mecanismos de defensa de los moluscos bivalvos con énfasis en pectinídeos. En: Maeda-Martínez, A.N. (ed.) *Los Moluscos Pectínidos de Iberoamérica. Ciencia y Acuicultura.* Limusa, México. pp. 127-140.
- Vázquez, J.A., M.P. González, M.A. Murado. 2005. Effects of lactic acid bacteria cultures on pathogenic microbiota from fish. *Aquaculture* 245(1):149-161.
- Vendrell, D., J.L. Balcazar, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, O. Gironés, J.L. Muzquiz. 2008. Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comp Immunol Microb.* 31(4):337-345.
- Venkat, H.K., N.P. Sahu, K.K. Jain. 2004. Effect of feeding *Lactobacillus*-based probiotics on the gut microflora, growth and survival of postlarvae of *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquac Res.* 35(5):501-507.
- Verschuere, L., G. Rambaut, P. Zorruelos, W. Verstraete. 2000. Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol Biol R.* 64(4):655-671.
- Vine, N.G., W.D. Leukes, H. Kaiser, S. Daya, J. Baxter, T. Hecht. 2004. Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. *J Fish Dis.* 27(6):319-326.
- Vine, N.G., W.D. Leukes, H. Kaiser. 2006. Probiotics in marine larviculture. *FEMS Microbiol Rev.* 30(3):404-427.
- Villamil Díaz, L.M., S.M. Infante Villamil, O.P. Lecompte Pérez. 2011. Uso de microorganismos benéficos en el alimento vivo para controlar la aparición de enfermedades durante el cultivo de animales acuáticos. *Mutis* 2(2):89-106.
- Vlachos, V., A.T. Critchley, A. Von Holy. 1999. Differential antibacterial activity of extracts from selected Southern African macroalgal thalli. *Bot Mar.* 42(2):165-173.
- Vlahogianni, T., M. Dassenakis, M.J. Scoullou, A. Valavanidis. 2007. Integrated use of biomarkers (superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation) in mussels

- Mytilus galloprovincialis* for assessing heavy metals' pollution in coastal areas from the Saronikos Gulf of Greece. *Mar Pollut Bull.* 54(9):1361-1371.
- Xing, J., T. Lin, W. Zhan. 2008. Variations of enzyme activities in the haemocytes of scallop *Chlamys farreri* after infection with the acute virus necrobiotic virus (AVNV). *Fish Shellfish Immunol.* 25(6):847-852.
- Wang, Y., Q. Gu. 2010. Effect of probiotics on white shrimp (*Penaeus vannamei*) growth performance and immune response. *Mar Biol Res.* 6(3):327-332.
- Wang, H., L. Qian, A. Wang, X. Guo. 2013. Occurrence and distribution of *Crassostrea sikamea* (Amemiya 1928) in China. *J Shellfish Res.* 32(2):439-446.
- Wolowczuk, I., C. Verwaerde, O. Viltart, A. Delanoye, M. Delacre, B. Pot, C. Grangette. 2008. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin Dev Immunol.* doi:10.1155/2008/639803.
- Wood, P.J., J.D. Erfle, R.M. Teather. 1988. Use of complex formation between congo red and polysaccharides in the detection and assay of polysaccharide hydrolases. *Methods Enzymol.* 160:59-74.
- Xi, D. 2011. Application of probiotics and green tea extract in post-harvest processes of Pacific oysters (*Crassostrea gigas*) for reducing *Vibrio parahaemolyticus* and extending shelf life. Tesis de Maestría, Oregon State University. 90 p.
- Xu, F., X. Guo, L. Li, G. Zhang. 2011. Effects of salinity on larvae of the oysters *Crassostrea ariakensis*, *C. sikamea* and the hybrid cross. *Mar Biol Res.* 7(8):796-803.
- Yanbo, W., X. Zirong. 2006. Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. *Anim Feed Sci Technol.* 127(3):283-292.
- Yeh, S.P., C.H. Chiu, Y.L. Shiu, Z.L. Huang, C.H. Liu. 2014. Effects of diets supplemented with either individual or combined probiotics, *Bacillus subtilis* E20 and *Lactobacillus plantarum* 7-40, on the immune response and disease resistance of the mud crab, *Scylla paramamosain* (Estampador). *Aquac Res.* 45(7):1164-1175.
- Yuan-Kun, L. 2006. *Microbial Biotechnology: Principles and Applications*. World Scientific Publishing, Singapore.

- Yue, S., B. Chinnapandi, H. Ge, X. Zou, X. Chen, C. Wang, W. Hu, J.F. Picimbon. 2014. A *Lactobacillus* cocktail changes gut flora and reduces cholesterolemia and weight gain in hyperlipidemia mice. SOJ Microbiol Infect Dis. 2:1-16.
- Zamora-Rodríguez, L.M. 2003. Aislamiento, identificación y conservación de cultivos de bacterias lácticas antagonistas de microbiota contaminante de sangre de matadero. Doctoral dissertation. Universidad de Girona, España.
- Zevenhuizen, L.P.T.M., C. Bertocchi, V.A. Neerven. 1986. Congo red absorption and cellulose synthesis by Rhizobiaceae. A Van Leeuw. 52(5):381-386.
- Zhang, X., S. Liao, Y. Li, W. Ji, H. Xu. 1998. Studies on pathogenic bacteria (*Vibrio natriegens*) of *Argopecten irradians* Lamark. J Ocean Univ Qingdao 28:426-432.
- Zhang, Q., B. Tan, K. Mai, W. Zhang, H. Ma, Q. Ai, X. Wang, Z. Liufu. 2011. Dietary administration of Bacillus (*B. licheniformis* and *B. subtilis*) and isomaltooligosaccharide influences the intestinal microflora, immunological parameters and resistance against *Vibrio alginolyticus* in shrimp, *Penaeus japonicus* (Decapoda: Penaeidae). Aquacult Res. 42(7):943-952.

## **11. ANEXOS**

## 11. ANEXOS

### ANEXO I. Artículos publicados

#### Artículo 1. (Aceptado y publicado)

Abasolo-Pacheco, F., Saucedo, P.E., Mazón-Suástegui, J.M., Tovar-Ramírez, D., Araya-Valencia, R., Ramírez-Orozco, J.M., Campa-Córdova, A.I. 2015. Isolation and use of beneficial microbiota from digestive tract of lions-paw scallop *Nodipecten subnodosus* and winged pearl oyster *Pteria sterna* in oyster aquaculture. *Aqua. Res.* doi:10.1111/are.12754.

#### Artículo 2. (Sometido)

Enhancing growth, survival and resistance to *Vibrio alginolyticus* in Catarina scallop (*Argopecten ventricosus*) treated with selected strains of probiotics during development. *Aquaculture*.

## **ANEXO II. Estancia científica realizada en el Instituto de Investigación y Tecnología Agroalimentarias (Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries, IRTA) en Tarragona, España**

**Bioensayo no publicado #1: Evaluación de cepas seleccionadas de *N. subnodosus* y *P. sterna* en la supervivencia y crecimiento de larvas del ostión japonés *C. gigas*.**

### **Materiales y métodos**

#### **Reactivación de bacterias probióticas**

Las cepas fueron aisladas del pectínido *Nodipecten subnodosus* (RL5, PB1-1, PB1-5 Y PB-1-6) y de la ostra perlera *Pteria sterna* (C3) en el Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste en México. Posteriormente, se colocaron en tubos criogénicos de 2 mL con medios de cultivo adecuados para cada especie adicionando glicerol al 30% como crioprotector. Se reactivaron en caldo MRS para *Lactobacillus sp.* y en TSC para *Bacillus sp.* Cabe mencionar que solo se lograron reactivar tres cepas, que son con las que se trabajaron en bioensayo.

#### **Obtención de reproductores y larvas**

Este bioensayo se realizó en el Institut de Recerca i Tecnologies Agroalimentàries (IRTA), en Sant Carles de la Ràpita en Tarragona, España, como parte de la estancia científica “Efecto de microorganismos probióticos en el cultivo larvario de ostiones”, comprendida del 1º de agosto al 30 de septiembre de 2014.

Los reproductores, que fueron acondicionados a temperaturas de 18-20 °C previo al desove, se obtuvieron de la generación F1 del IRTA (Figura-A 7), situados en la bahía del Fangar, en la concesión de Carlos Bori. Las larvas fueron producidas por el laboratorio de producción del IRTA. El desarrollo embrionario tuvo un tiempo de 40 h hasta la etapa de larvas D-veliger (Figura-A 7) y se realizó en tanques de

1000 L a una temperatura que osciló entre los 20 y 21 °C. Las larvas se alimentaron con la microalga *Isochrysis galbana* en concentraciones de  $15 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup> (larvas de 72 h) para el bioensayo correspondiente.



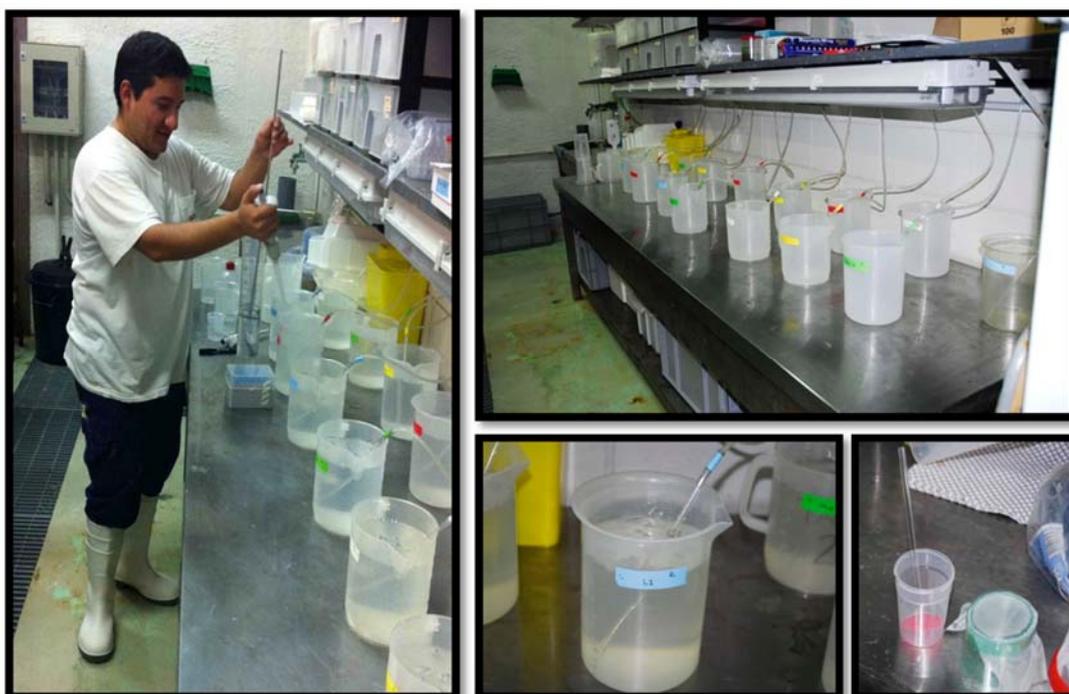
**Figura-A 7.**– Reproductores F1 del IRTA de la ostra rizada *Crassostrea gigas*, y tanques desarrollo larvario.

### Diseño experimental

Este bioensayo tuvo una duración de 12 días. Para esto se utilizaron 270,000 larvas de 72 h de edad (73.6 µm de longitud), obtenidas de un desove controlado de organismos adultos de *C. gigas* en el laboratorio de producción de semillas del IRTA. Las larvas se distribuyeron aleatoriamente en tres réplicas para cada tratamiento a una densidad de 10 larvas mL<sup>-1</sup> en cada unidad experimental.

Para este bioensayo los tratamientos fueron los siguientes: (1) RL5: *Lactobacillus graminis*; (2) MIX-B: (*Bacillus flexus* + *Bacillus firmus*); (3) MIX-LB: L1+MIX-B; (4) Eritromicina (antibiótico usado en IRTA) y (5) Control (sin tratamiento). Todas las cepas con potencial probiótico fueron administradas a una concentración final de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, tanto solas, como en mezclas, en cada una de las réplicas establecidas por tratamiento. Cada tratamiento experimental se realizó en unidades experimentales plásticas de 2L de capacidad (Figura 2-A) , con agua de mar filtrada a 1µm y esterilizada con UV, y con una temperatura de 20±1°C. Todos los tratamientos se alimentaron con la microalga *I. galbana* a una concentración de 30-40 × 10<sup>3</sup> células mL<sup>-1</sup>. El tratamiento se suministraba después

de la alimentación. Se hicieron recambios totales cada 48 h (Figura-A 8). Durante los recambios se tomaron muestras para determinar la supervivencia y crecimiento durante 9 días. La supervivencia se determinó mediante conteos con la ayuda de un microscopio compuesto y una cámara de conteo tipo Rafter, así mismo con la ayuda de un micrómetro ocular se llevaron a cabo las mediciones de 30 larvas de forma aleatoria.



**Figura-A 8.**– Diseño experimental para evaluar las bacterias probióticas en larvas de la ostra rizada *Crassostrea gigas*.

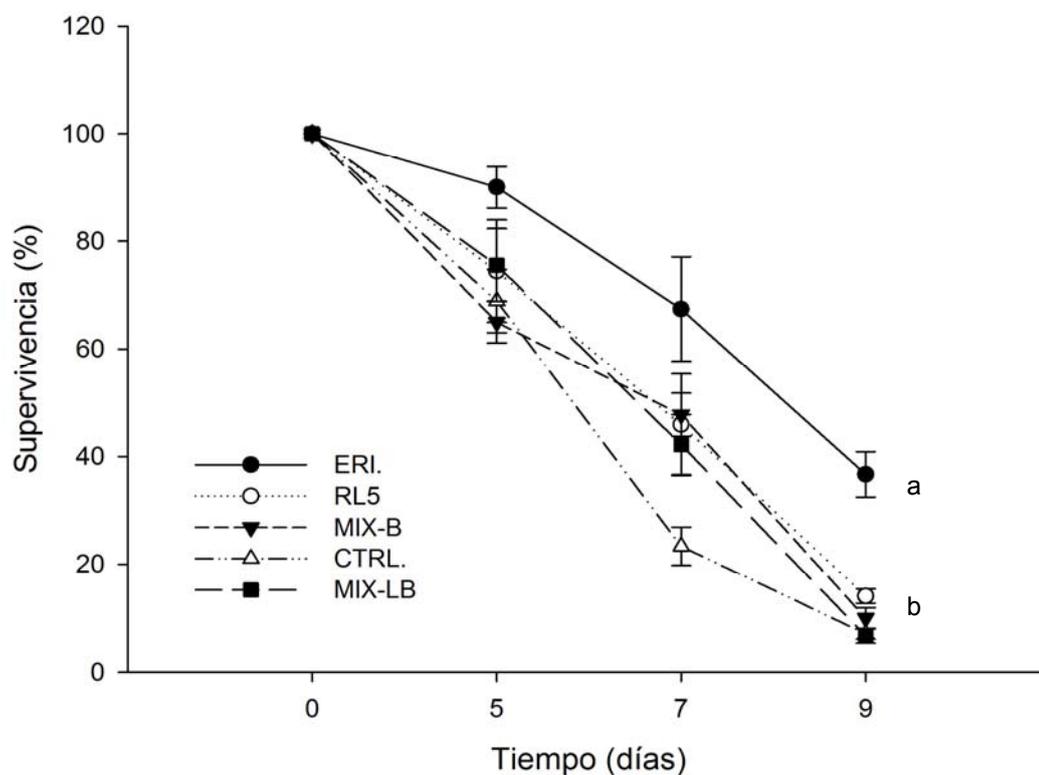
### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA), junto con pruebas de rangos múltiples de medias de Tukey, para detectar diferencias significativas en el crecimiento y supervivencia de larvas de *C. gigas*. El nivel de significancia se estableció en  $P < 0.05$ .

## **Resultados**

### **Supervivencia**

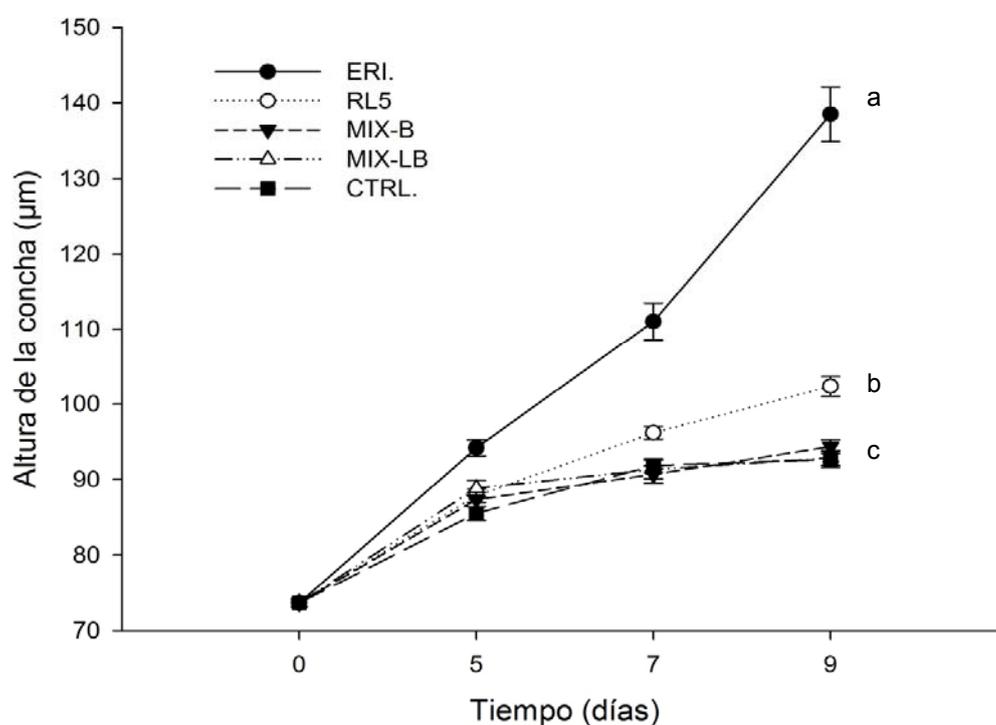
La supervivencia larvaria varió significativamente ( $F= 15.8$ ) entre los tratamientos evaluados (Figura-A 9). Los mejores porcentajes de supervivencia se encontraron en larvas tratadas con el antibiótico eritromicina (36%) en comparación con el grupo control (7%). Así mismo, las larvas tratadas con el grupo de probióticos no presentaron diferencias significativas, sin embargo, se observó que el grupo de larvas tratadas con la cepa RL5 (14%) mostraron mejores valores de supervivencia que el grupo control.



**Figura-A 9.**– Supervivencia de *Crassostrea gigas* tratadas con RL5: *Lactobacillus graminis*; MIX-B: (*Bacillus flexus* + *Bacillus firmus*); MIX-LB: L1+MIX-B; Eritromicina (antibiótico usado en IRTA) y CTRL.: Control (sin tratamiento ni antibiótico). Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

## Crecimiento

Con respecto al crecimiento absoluto se encontraron diferencias significativas ( $F= 17.6$ ) entre los tratamientos evaluados (Figura-A 10). Los valores más altos se encontraron con el grupo tratado con eritromicina ( $138.5 \pm 3.6 \mu\text{m}$ ) y con RL5 ( $102.3 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ) en comparación con el grupo control ( $92.8 \pm 1.1 \mu\text{m}$ ).



**Figura-A 10.**– Crecimiento absoluto ( $\mu\text{m}$ ) de *Crassostrea gigas* evaluadas con los tratamientos correspondientes. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

## Discusión y conclusiones

Los resultados obtenidos sugieren que los tratamientos con las bacterias benéficas, seleccionadas previamente de dos organismos bivalvos, pueden ser viables para disminuir las mortalidades y aumentar rendimiento en crecimiento en talla (longitud) de larvas de *C. gigas* dentro de un sistema de cultivo controlado, sin embargo, los resultados no fueron del todo buenos, y entre otras cosas esto se puede atribuir en gran medida a las unidades experimentales utilizadas en los cultivos, además del bajo volumen de agua utilizado. Suponemos que la recirculación de aire en la columna de agua no fue adecuada permitiendo así acumulación de materia orgánica en espacios sin recirculación. Si bien es cierto que el antibiótico (control positivo) mostró los mejores resultados de crecimiento y supervivencia, también se observaron altos porcentajes de mortalidad, reforzando así la teoría de las unidades experimentales de cultivo usadas. Se debe destacar que en este estudio se buscaba reemplazar al antibiótico por bacterias probióticas que dieran mejor rendimiento en crecimiento y supervivencia con respecto al control, lo cual si fue observado, específicamente en *L. graminis* y en la mezcla de *Bacillus* sp. Finalmente, este trabajo representa una contribución a la investigación del uso de probióticos en moluscos bivalvos, los cuales son muy escasos y cada vez se hacen más necesarios. Por lo que se sugiere evaluar las cepas probióticas en sistemas de cultivo piloto con unidades experimentales de mayor volumen, y utilizar bacterias autóctonas, que podrían tener mejores resultados que las utilizadas en este estudio.

### **ANEXO III. Bioensayo no publicado #2: Evaluación de dos cepas de *Lactobacillus* sp. y mezclas de cepas probióticas en la supervivencia de larvas de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus***

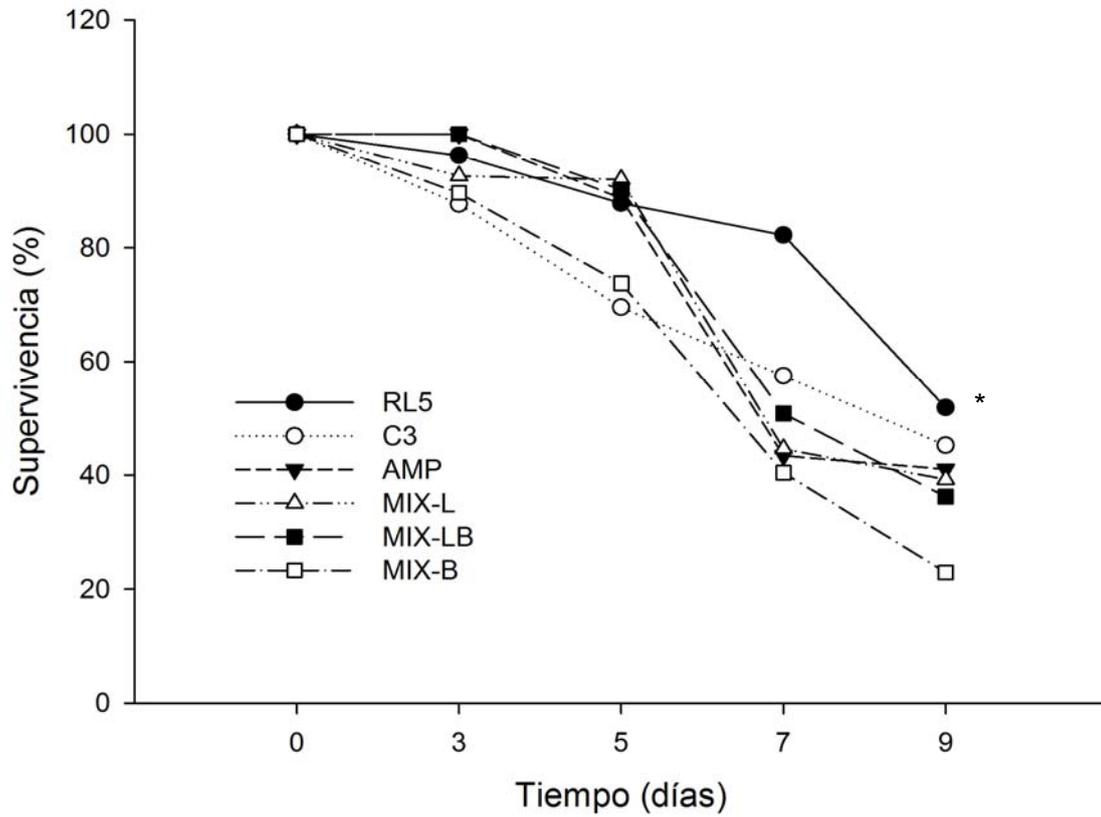
#### **Diseño experimental**

Adicionalmente se realizó un bioensayo con larvas de la almeja mano de león *Nodipecten subnodosus*, con el fin de evaluar las cepas seleccionadas en este trabajo de forma individual y en combinación. Los tratamientos evaluados incluyeron: (1) L1: *Lactobacillus graminis*; (2) L2: *Lactobacillus plantarum*; (3) MIX-L: L1+L2; (4) MIX-B: B1 + B2 + B3 (misma mezcla de *Bacillus* spp. usada en este trabajo); (5) MIX-LB: MIX-L + MIX-B; (6) Ampicilina (10 mg L<sup>-1</sup>) y (7) Sin tratamiento experimental. La dosis administrada en los diferentes tratamientos de bacterias fue de 1 × 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

Las larvas fueron producidas y donadas por el Laboratorio de Mejoramiento Genético en Acuicultura del CIBNOR. El cultivo se realizó en el Laboratorio de Cultivo de Moluscos del CIBNOR. El diseño experimental se hizo siguiendo la metodología descrita en la sección 6.2.8 pero en unidades experimentales cónicas de fibra de vidrio de 60 L, rellenas con 20 L de agua de mar filtrada. La temperatura se fijó a 22 ± 1 °C y la alimentación fue a base de la misma mezcla de microalgas usada en este trabajo (ver sección 6.2.5).

#### **Resultados y discusión**

La mayor supervivencia se observó en el grupo tratado con la cepa RL5 (*L. graminis*) y la menor supervivencia en el grupo tratado con MIX-B (Figura-A 11). Dado que este mismo efecto se reporta también en larvas de *A. ventricosus* de este trabajo, parece claro que se requiere la realización de más estudios dirigidos a dilucidar el mecanismo de acción de la mezcla de *Bacillus* spp. en larvas de bivalvos marinos.



**Figura-A 11.**– Supervivencia (%) de larvas de la almeja mano de león tratadas con las cepas probióticas seleccionadas. (\*)= Denota diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos. Se señala con un círculo rojo el tratamiento donde se registra la menor supervivencia.

**ANEXO IV. Bioensayo no publicado #3: Evaluación de concentraciones y mezclas de *Bacillus* spp. y *Lactobacillus* spp. en la supervivencia, crecimiento y asentamiento de larvas y supervivencia, crecimiento, composición bioquímica, reto contra *V. alginolyticus* en juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus***

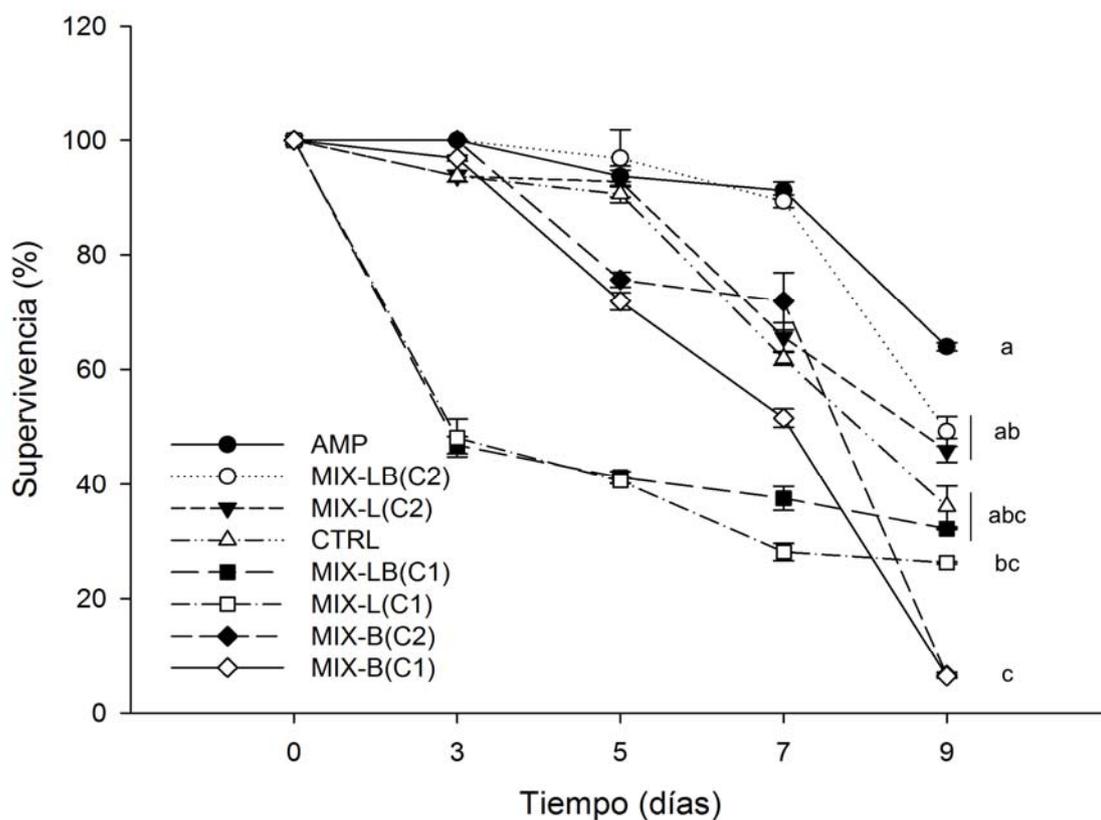
**Materiales y métodos**

El diseño experimental para este bioensayo fue el mismo que se reporta con las larvas y juveniles de *A. ventricosus* (ver secciones 6.2.8 y 6.2.9) , con la diferencia de que en este trabajo se utilizaron además de la ampicilina y el grupo control, las mezclas de cepas (MIX-L, MIX-B y MIX-LB) en dos concentraciones: C1 a  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> y C2 a  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Adicionalmente, se realizó un reto contra *V. alginolyticus* siguiendo la metodología establecida en la sección 6.2.10).

**Resultados**

**Supervivencia**

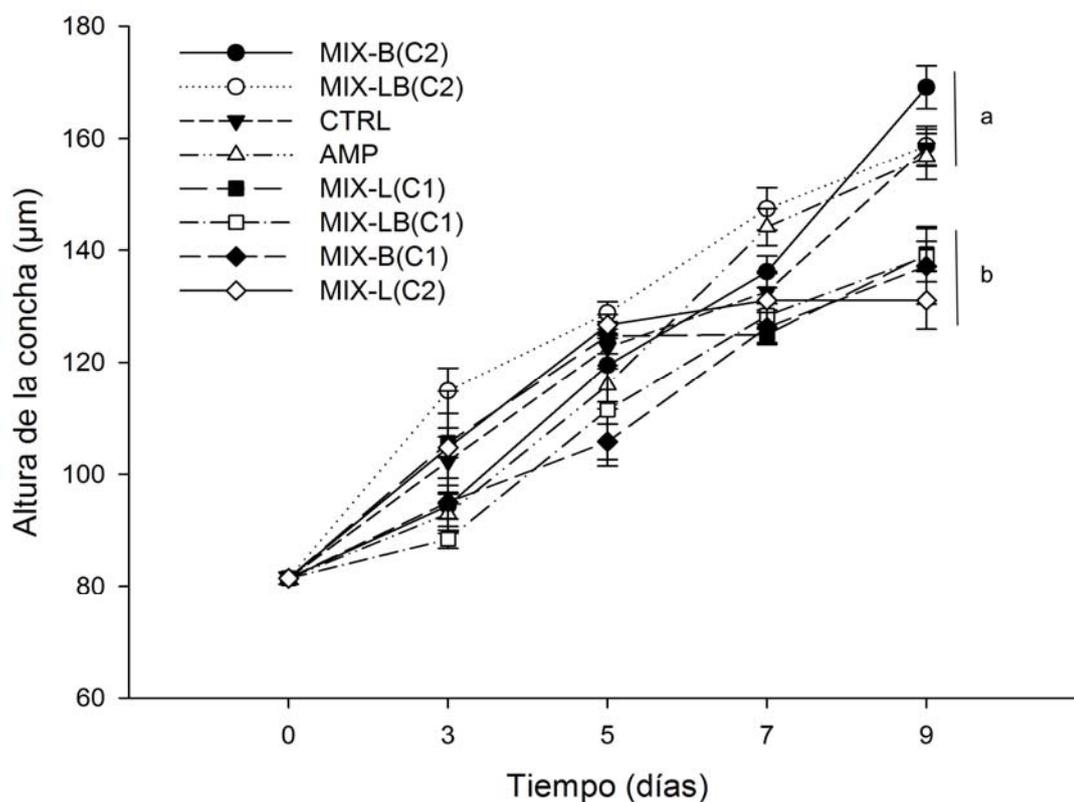
La supervivencia larvaria de *A. ventricosus* presentó diferencias significativas (F= 23.7) entre los tratamientos evaluados (Figura-A 1). Al final del bioensayo (día 9), la mayor supervivencia de larvas se presentó con la mezcla de cepas MIX-LB(C2) con 49% y MIX-L(C2) con 46% comparadas con el control (36%). El tratamiento con la ampicilina AMP (63%) presentó altos porcentajes de supervivencia, a diferencia de las mezclas de MIX-B en ambas concentraciones para C1 y C2 (6%).



**Figura-A 1.-** Porcentaje de supervivencia de la almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) tratadas con 2 concentraciones, (C1):  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> y (C2):  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, de las mezclas MIX-L (RL5+C3); MIX-B (PB1-1+PB1-5+PB1-6); MIX-LB (MIX-L+MIX-B), el antibiótico AMP (ampicilina a 10 ppm); y CTRL (sin tratamiento). Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

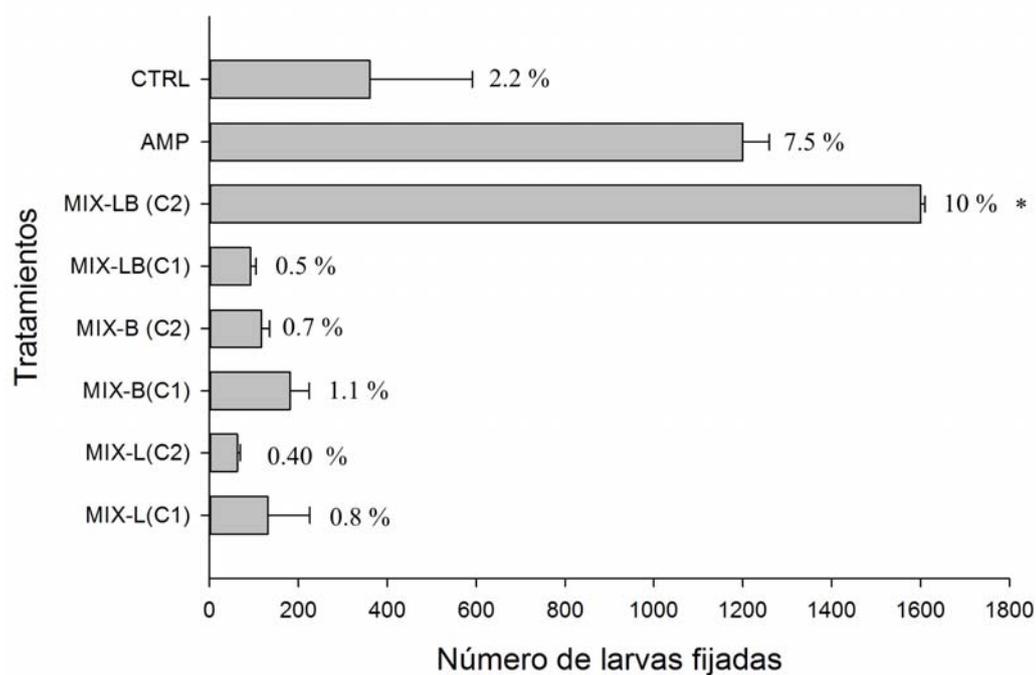
### Crecimiento absoluto

Se encontraron diferencias significativas ( $F= 17.4$ ) entre los tratamientos evaluados en el crecimiento absoluto de larvas (Figura-A 2). Para el final del bioensayo los valores mas altos de crecimiento se dieron con MIX-B(C2) ( $169.1 \pm 3.8 \mu\text{m}$ ) y MIX-LB(C2) ( $158.67 \pm 3.5 \mu\text{m}$ ), comparados con el control ( $158.32 \pm 3.5 \mu\text{m}$ ) y MIX-L(C2) ( $131 \pm 5.14 \mu\text{m}$ ).



**Figura-A 2.** – Crecimiento absoluto de la altura de la concha de larvas de la almeja Catarina (*Argopecten ventricosus*) tratadas con 2 concentraciones, (C1):  $1 \times 10^5$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  y (C2):  $1 \times 10^6$  UFC  $\text{mL}^{-1}$ , de las mezclas. Los datos representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

Los porcentajes más altos de fijación, también se dieron con los tratamientos MIX-LB (10%) y AMP (7.5 %), comparados con el grupo control (2.2 %) y el resto de los tratamientos en mezcla (Figura-A 3).



**Figura-A 3.** – Asentamiento larvario de la almeja Catarina tratadas con las mezclas de las bacterias probióticas seleccionadas. Las barras representan la media  $\pm$  DE. y se muestra el porcentaje de fijación. (\*) representa diferencias significativas entre los tratamientos ( $P < 0.05$ ).

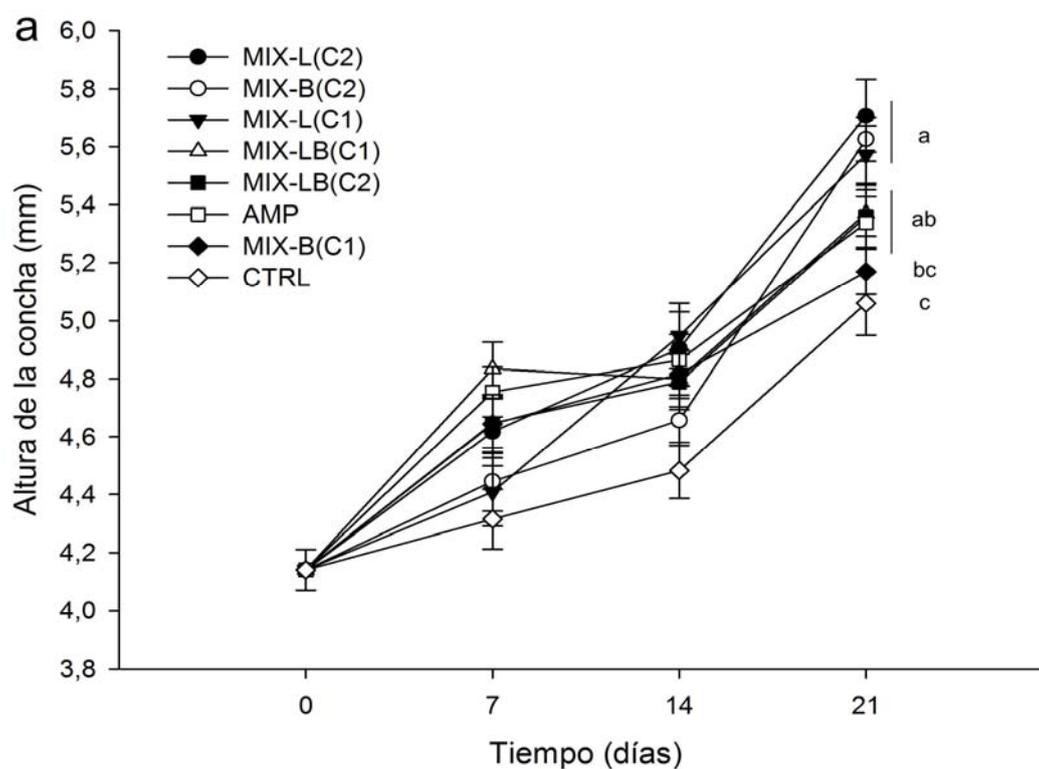
## Evaluación de las mezclas de cepas seleccionadas en la supervivencia y crecimiento de juveniles de *A. ventricosus*

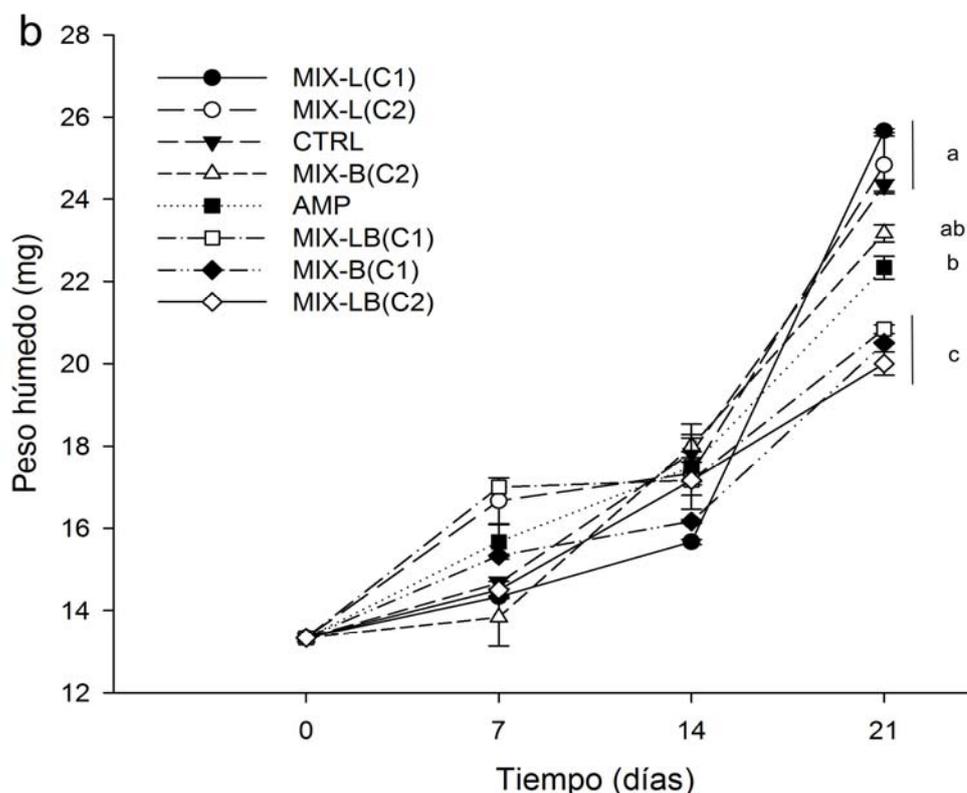
### Supervivencia

La supervivencia larvaria fue del 100% durante los 21 días de tratamiento en un cultivo experimental.

### Crecimiento absoluto

Se encontraron diferencias significativas en el incremento en talla ( $F= 15.4$ ) y peso ( $F= 18.3$ ) de los juveniles tratados con las diferentes concentraciones de las mezclas. Los mejores valores de crecimiento en talla se dieron con MIX-L (C2) ( $5.7 \pm 0.1$  mm), MIX-B (C2) ( $5.6 \pm 0.07$  mm) y MIX-L (C1) ( $5.5 \pm 0.1$  mm), comparado con el control ( $5.03 \pm 0.1$  mm) (Figura-A 4a). Por el contrario, los mayor ganancia en peso ocurrió con MIX-L (C1) ( $25,6 \pm 0.05$  mg) y MIX-L (C2) ( $24.8 \pm 0.7$  mg), comparado con el control ( $24.3 \pm 0.1$  mg) y MIX-LB(C2) ( $20 \pm 0.2$  mg) (Figura-A 4b).





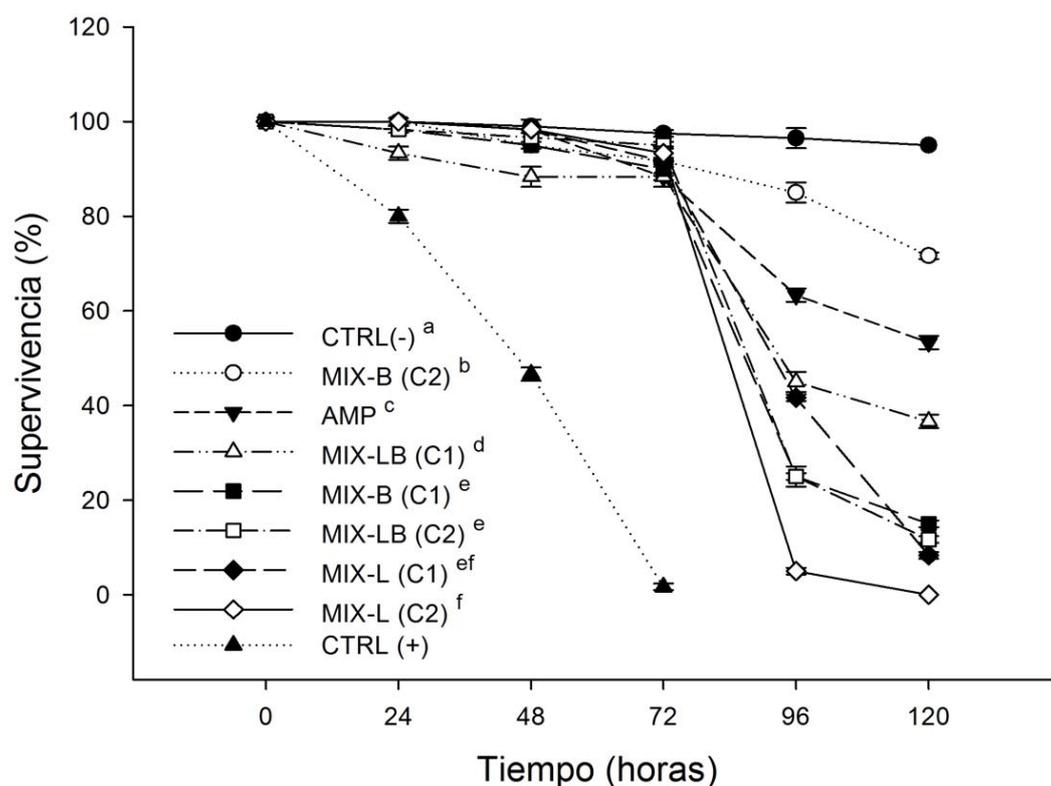
**Figura-A 4.-** Crecimiento absoluto en la altura (a) y peso (b) de la concha de juveniles de la almeja Catarina tratados con las concentraciones de mezclas de las cepas probióticas seleccionadas. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

**Reto con *V. alginolyticus* (CAIM57) de juveniles de la almeja Catarina *A. ventricosus* tratadas con las dos concentraciones de mezclas de cepas seleccionadas.**

### Supervivencia

La supervivencia de los juveniles fue de 0% en CTRL (+) después de 72 h de exposición a *V. alginolyticus* y significativamente mejorada (>80%;  $P < 0.05$ ) en todos los juveniles tratados con las mezclas en ambas concentraciones (Figura-A 5).

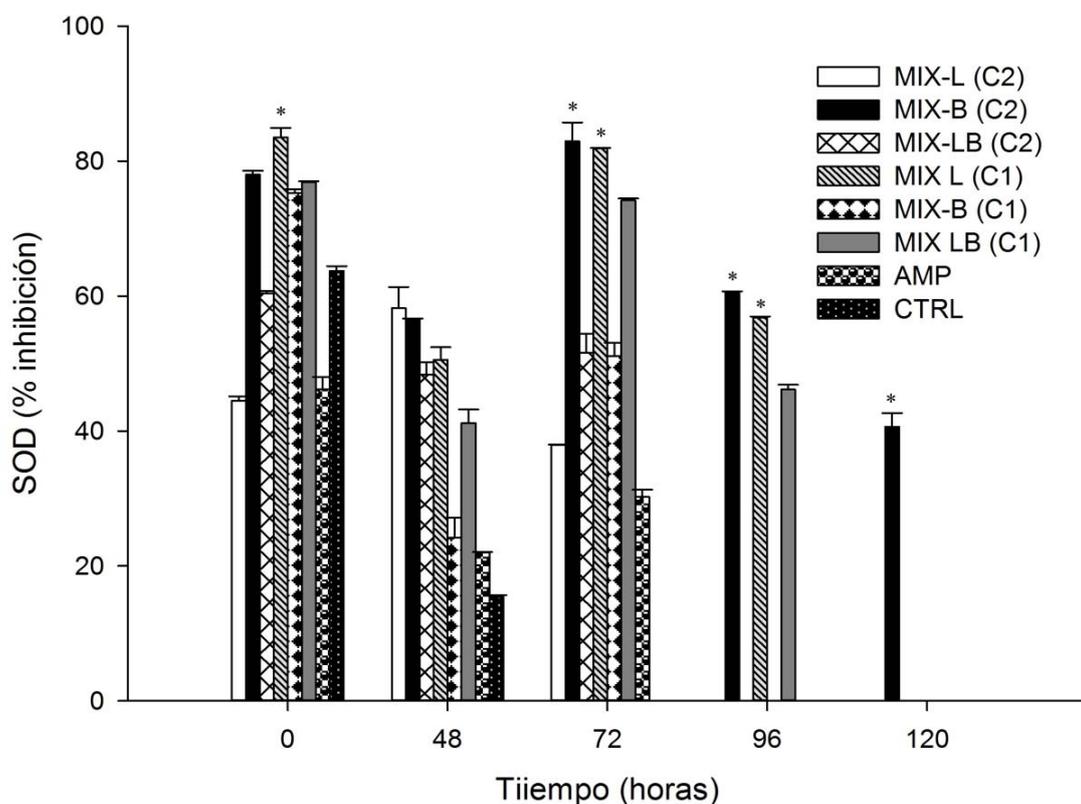
Después de 120 h de reto experimental, las supervivencias más altas se dieron con el tratamiento MIX-B (72%) y los porcentajes más bajos con el MIX-L en las dos concentraciones (C1: 8% y C2: 0%).



**Figura-A 5.**– Supervivencia de juveniles de la almeja Catarina tratados con las mezclas de cepas probióticas seleccionadas y retadas con *Vibrio alginolyticus*. CTRL (-) representa a juveniles sin tratamiento y sin retar y CTRL (+) representa a juveniles sin tratamiento y retados. Los puntos y las líneas verticales representan la media  $\pm$  DE. Los tratamientos representados en la leyenda están organizados en el mismo orden que en la figura. Letras diferentes denotan diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) entre tratamientos.

### **Actividad de la SOD**

Antes de la infección, los juveniles tratados con MIX-L (C1) y MIX-B (C2) presentaron significativamente mayor actividad SOD (83 y 78 %, respectivamente) que en el grupo control (63 %) y AMP (46 %). De igual forma, la actividad de la SOD post-infección en los juveniles tratados con MIX-B (C2) durante las 120 h fue mayor, presentándose una actividad significativamente mayor a las 72 h con esta y con MIX-L (C1) (82 y 81 %, respectivamente) respecto a la registrada en los otros tratamientos y control. Los organismos del CTRL (+) murieron a las 72 h y por ello no se registró actividad posterior de la SOD. La respuesta antioxidante en presencia del patógeno fue más rápida con el tratamiento MIX-B (C2) y MIX-L (C1) (Figura-A 6).



**Figura-A 6.** – Actividad de la SOD determinada por el porcentaje de inhibición de la formación del complejo WST-1 (water- soluble tetrazolium) Formazan en juveniles de almeja Catarina tratados previamente con la mezcla de bacterias probióticas seleccionadas y posteriormente retados durante 120 horas con *V. alginolyticus* (cepa CAIM57).

### Discusión y conclusiones

Las mezclas de cepas probióticas suelen funcionar mejor que de forma individual (Verschuere *et al.*, 2000), esto se ha demostrado ya en diferentes trabajos (Mahdhi *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2014; Yeh *et al.*, 2014). Así mismo, la relación dosis-efecto de un probiótico se debe determinar cuidadosamente con la finalidad de evitar una sobredosis, lo cual puede resultar en una disminución en su efecto y un incremento en los costos, o contrariamente, usar dosis muy bajas reduce la eficacia del probiótico (Vine *et al.*, 2006). Un ejemplo de esto, es el observado en juveniles

de *N. subnodosus* con una mezcla de cepas probióticas (*B. cepacia* y *P. aeruginosa*) en concentraciones de  $1 \times 10^9$  UFC mL<sup>-1</sup>, las cuales no mostraron diferencias significativas de crecimiento y supervivencia (Granados-Amores *et al.*, 2012) confirmando una disminución de su efecto por las altas concentraciones utilizadas. Contrariamente, con la misma mezcla probiótica pero en concentraciones de  $5 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> se observó una mejor supervivencia en juveniles de *C. corteziensis* (Campa-Córdova *et al.*, 2009a). En este bioensayo las concentraciones de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> en todas las mezclas evaluadas son las que mejores resultados presentaron tanto en larvas como en juveniles de *A. ventricosus*, en comparación con las mezclas en concentraciones de  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. El tratamiento MIX-LB y MIX-L presentaron mejores valores de supervivencia en larvas mientras que en MIX-B se observó un mejor crecimiento larvario. En larvas de *C. corteziensis* y en larvas de *L. vannamei* se ha observado que la supervivencia mejora subiendo las concentraciones de una mezcla de cepas probióticas de  $1 \times 10^4$  UFC mL<sup>-1</sup> a  $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup>. Por otro lado, los juveniles de *A. ventricosus* tratados con MIX-L en ambas concentraciones ( $1 \times 10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> y  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>) presentaron mejores valores de crecimiento en peso y talla. El efecto del sinergismo entre cepas y la acción benéfica de los *Lactobacillus* spp. ha sido ya discutido en el presente estudio (sección 8.2). Finalmente, respecto a la protección evaluada con las mezclas encontramos que todos los tratamiento protegieron a los juveniles de *A. ventricosus* a las 72 h post-infección, pero particularmente MIX-B en una concentración de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup> que presentó mayor supervivencia de juveniles a las 120 h post-infección, este resultado esta apoyado con un incremento de la actividad de la SOD, lo cual sugiere una respuesta del sistema inmune. Por ejemplo, en larvas de *C. virginica* retadas con *Vibrio* sp. previamente tratadas con la cepa probiótica OY15, se observó una mejor supervivencia en concentraciones de  $1 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> en comparación con  $1 \times 10^2$  UFC mL<sup>-1</sup> (Kapareiko *et al.*, 2011). En este bioensayo se puede concluir que el efecto sinérgico de las cepas se ve beneficiado en concentraciones de  $1 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>, lo cual coincide con estudios previamente reportados (ver sección 8.2).